

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Doctorado en Microbiología**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis genómico de *Enterobacterales* productores de  
carbapenemasas de interés clínico en el Hospital  
Universitario 12 de Octubre**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Jenifer Villa García**

**Madrid, 2020**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Doctorado en Microbiología**



**Análisis genómico de *Enterobacterales* productores de  
carbapenemasas de interés clínico en el Hospital  
Universitario 12 de Octubre**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**Jenifer Villa García**

Bajo la dirección de:

**Dr. Fernando Chaves Sánchez**

**Dr. Jesús Mingorance Cruz**

Realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre



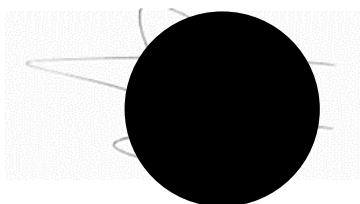
El Doctor **Fernando Chaves Sánchez**, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre e investigador principal del grupo de Epidemiología Molecular de Infecciones Hospitalarias y Emergentes de la Fundación de Investigación Biomédica i+12,

**CERTIFICA QUE:**

**Jenifer Villa García** ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de doctor, titulado:

**Análisis genómico de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas de interés clínico en el Hospital Universitario 12 de Octubre**

Y para que así conste, firma la presente certificación en Madrid, 2020



Fdo: Dr. Fernando Chaves Sánchez



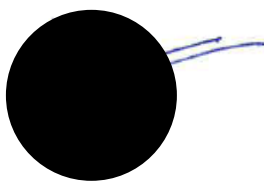
El Doctor **Jesús Mingorance Cruz**, investigador principal del grupo de Microbiología Molecular, Área de Enfermedades Infecciosas e Inmunidad del Instituto de Investigación IdiPaz,

**CERTIFICA QUE:**

**Jenifer Villa García** ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de doctor, titulado:

**Análisis genómico de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas de interés clínico en el Hospital Universitario 12 de Octubre**

Y para que así conste, firma la presente certificación en Madrid, 2020



Fdo: Dr. Jesús Mingorance Cruz



*A la memoria de mi padre, Enrique Villa*

*A mi madre, hermana y familia*

*A Juan Miguel y Lucía*

## **AGRADECIMIENTOS**

Desde que inicié la residencia de Microbiología me di cuenta que la bacteriología formaría una parte importante de mi vida y que la investigación sería uno de los motores que me impulsaría a seguir estudiando y a emocionarme con cada trabajo iniciado.

La mayoría de trabajos aquí presentados han sido financiados gracias a los proyectos concedidos al grupo de investigación de Epidemiología Molecular de Infecciones Hospitalarias y Emergentes, liderado por el Dr. Fernando Chaves, como investigador principal, y que forma parte de la Red de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI).

En primer lugar, me gustaría mostrar mi agradecimiento a los directores de esta tesis. Al Dr. Fernando Chaves, mi maestro y mentor, gracias por haber confiado en mí, por haberme enseñado todo lo que sé de bacteriología y por los sabios consejos que me has aportado durante los años de la residencia como tutor y, durante los últimos años como compañeros de especialidad. Ha sido un placer haber trabajado a tu lado y gracias por haberme convencido para iniciar este proyecto que hoy llega a su fin. No puedo olvidarme de mi otro director de tesis, el Dr. Jesús Mingorance, al que estaré eternamente agradecida por haberse involucrado hasta el final en cada uno de los estudios. Muy agradecida por sus consejos en bioinformática y biología molecular, de los que he aprendido muchísimo. Espero que sigamos colaborando en el futuro y sigamos cosechando nuevas publicaciones.

Al Dr. Rafael Delgado, jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre. Por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de microbiólogos y por incitarme a seguir en el mundo de la investigación.

A mis compañeros microbiólogos, M<sup>a</sup> Ángeles, Ana, Mónica, Paula, Alfredo, Lola, Isa, Irene, Esther y Raúl. Gracias por enriquecerme cada día con vuestros conocimientos en

## **Agradecimientos**

---

bacteriología, hongos, parásitos y virus. Me siento afortunada de teneros como compañeros y poder seguir desarrollándome como profesional junto a todos vosotros.

A todo el personal técnico del laboratorio de Microbiología. Gracias por haberme enseñado la base de todo lo que he aprendido, por vuestro cariño, cercanía y por haberme acogido como una más de vosotros. Quería hacer una mención especial al equipo técnico que ha participado en esta tesis, Esther, Rosa, Mar, Antonia y Merce, sin vuestra ayuda y vuestros ánimos no hubiera sido capaz de terminar. Y otra mención especial a las chicas de urocultivos, Ana Madrid, Ana Pérez, Maribel, Alicia y Raquel, que me han apoyado en la parte final de esta tesis. Gracias por haberme escuchado y por vuestra paciencia infinita.

A mis compañeras de residencia, Carmen, Adela, Joshi, Esther, Laura, Paty y Sara. Gracias por acompañarme durante una de las mejores etapas de mi vida y por estar ahí en los buenos y malos momentos, sin vosotras no hubiera sido lo mismo.

A los investigadores y residentes que han colaborado en cada experimento de esta tesis, Esther, Patricia, Dafne, Jaime Lora, David Arana, Raúl, Octavio, M<sup>a</sup> Ángeles y Alhena. Gracias por vuestro trabajo y esfuerzo y por haberme transmitido vuestra energía y entusiasmo con cada trabajo que habéis hecho.

A mis queridas compañeras y amigas de investigación, Olalla y Joanna. Gracias por vuestros consejos, por vuestra ayuda en preparar cada experimento, cada análisis y por formar parte de mi vida. Espero poder seguir guardando recuerdos con vosotras.

A mi compañera, amiga y casi hermana Esther Viedma, por su comprensión, cariño y dedicación. Por haberme enseñado todo lo que sé y por compartir cada día la pasión por las bacterias, por sus genomas y por la vida. Eres un ejemplo para mí.



A mis amigos Pedro y Rebe, por ayudarme con el broche final de esta tesis, la maquetación y el diseño de la portada que refleja una parte de mi personalidad.

A mi madre, mi hermana, Nacho y Alex. Gracias por vuestros ánimos, apoyo y cariño en los días más grises, por haber confiado en mí y por haberme inculcado los valores de trabajo y esfuerzo, sin vuestro apoyo esto no hubiera sido posible. A mi padre, gracias por transmitirme tu fuerza para seguir hacia delante, por enseñarme que todo esfuerzo tiene su recompensa y por obligarme a no rendirme jamás. Siempre estarás en mi recuerdo y ocuparás un lugar privilegiado en mi corazón.

Por último, quería expresar mi más profundo agradecimiento a Juan Miguel, mi marido y mi compañero de vida. Gracias por cuidar de mí, por tenderme la mano siempre que lo he necesitado, por guiar mis días oscuros y por darme a la persona más especial que ahora llena nuestras vidas, la pequeña Lucía. Gracias por haberme ayudado a terminar esta tesis y por entender que la Microbiología es parte de mi vida.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>15</b>
<b>RELACIÓN DE TABLAS .....</b>	<b>19</b>
<b>RELACIÓN DE FIGURAS .....</b>	<b>23</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>33</b>
1. Generalidades sobre el orden <i>Enterobacterales</i> .....	35
2. La crisis mundial de la resistencia a los antibióticos. ....	36
3. <i>Enterobacterales</i> resistentes a carbapenémicos (ERC).....	37
4. Carbapenémicos. ....	38
5. Epidemiología de EPC. ....	66
6. Papel de los EGMs en la diseminación de carbapenemasas entre los clones de alto riesgo de las especies de <i>Enterobacterales</i> . ....	74
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>77</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>81</b>
1.Diseño y descripción de las etapas del estudio. ....	83
2.Características de los pacientes. ....	84
3.Características de los aislamientos clínicos de EPC. ....	85
4.Identificación de los aislamientos de EPC.....	86
5.Estudio de sensibilidad a los antibióticos ....	86
6.Detección de carbapenemasas.....	88
7.Tipificación Molecular.....	96
8.Estudio de los elementos genéticos móviles de transferencia horizontal. ....	105
9.Secuenciación de Genoma Completo. ....	116
10. Análisis estadístico ....	124

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>137</b>
1. Evolución temporal de los aislamientos de EPC durante un periodo de 10 años en el Hospital Universitario 12 de Octubre. ....	139
2. Estudio epidemiológico y molecular de los aislamientos de <i>E. cloacae</i> productores de carbapenemasa durante 2007-2012.....	142
3. Estudio epidemiológico y molecular de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de carbapenemasa durante 2009-2014.....	163
4. Estudio molecular de los aislamientos de <i>C. freundii</i> productores de carbapenemasa durante 2009 – 2014. ....	186
5. Estudio molecular de los aislamientos de <i>Enterobacter hormaechei</i> productores de carbapenemasa tipo NDM-7 durante 2016 – 2017. ....	203
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>215</b>
1. Diseminación policlonal de aislamientos de <i>E. cloacae</i> productores de carbapenemasa tipo VIM-1.....	218
2. Emergencia y diseminación del clon de alto riesgo de <i>K. pneumoniae</i> ST11 productor de OXA-48. ....	222
3. Papel de los EGMs en la diseminación de los aislamientos de <i>C. freundii</i> productores de carbapenemasas.....	228
4. Emergencia del clon de alto riesgo ST78 de <i>E. hormaechei</i> productor de NDM-7....	232
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>239</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>245</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>269</b>

## RESUMEN

La emergencia y la diseminación de las especies de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas (EPC) es un problema de Salud Pública que se ha convertido en una prioridad asistencial. La resistencia a los carbapenémicos ha supuesto un gran reto para los clínicos y los profesionales encargados de la vigilancia y control de las infecciones, debido a las limitaciones en los tratamientos terapéuticos. El principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en *Enterobacterales* es la producción de carbapenemasas que suelen estar asociados a elementos genéticos móviles (EGMs) y que se encargan de vehiculizar y transferir estos genes entre las diferentes especies de *Enterobacterales*.

La situación epidemiológica en España ha ido empeorando en los últimos años. En la actualidad, nuestro país se encuentra en el estadio 4 de la escala epidemiológica europea, lo que significa que, la mayoría de los brotes detectados se han asociado a una transmisión inter-regional. En la mayoría de los hospitales españoles se ha identificado a la carbapenemasa OXA-48 como la más prevalente, la cual se ha asociado con una cepa de *Klebsiella pneumoniae* ST11, que es considerado un clon de alto riesgo que se ha diseminado por todo el país. Por otro lado, la metalo- $\beta$ -lactamasa de tipo VIM-1 es la segunda carbapenemasa más frecuente detectada en *Enterobacterales* y ha dado lugar a brotes esporádicos a lo largo de toda la geografía española, manteniéndose constante en los últimos años.

Desde que se detectó el primer caso de *Enterobacter cloacae* complex con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos en el Hospital Universitario 12 de Octubre en 2007, se ha observado un incremento significativo en el aislamiento de diferentes especies de EPC, que afectaron a pacientes ingresados en diferentes servicios clínicos del hospital. Dada la importancia de las carbapenemasas como principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en *Enterobacterales*, el objetivo principal de esta tesis fue estudiar la

epidemiología molecular de los aislamientos de EPC en el Hospital Universitario 12 de Octubre durante un periodo de 10 años de estudio (2007-2017).

En el primer estudio se planteó como objetivo estudiar la epidemiología molecular de los aislamientos clínicos de *E. cloacae* con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos durante 2007- 2012. Durante los 6 años de estudio, se detectaron 73 aislamientos de *E. cloacae* con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos, de los cuales, 37 aislamientos fueron portadores de la carbapenemasa VIM-1, 5 aislamientos con KPC-2 y un aislamiento con VIM-2. Entre las características clínicas de los pacientes que sufrieron infecciones/colonizaciones por *E. cloacae* VIM-1 destacaron que procedían frecuentemente del servicio de Nefrología (43,2%), presentaron como factor de riesgo insuficiencia renal crónica (43,2%), fueron portadores de catéter doble jota (29%) y padecieron con mayor frecuencia infecciones del tracto urinario (51%). Los aislamientos de *E. cloacae* VIM-1 mostraron una gran diversidad clonal, lo que sugirió que la diseminación de estos aislamientos no dependió de la propagación de un único clon, sino que la diseminación del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> estuvo asociada con la transferencia de diferentes EGMs. El gen *bla*<sub>VIM-1</sub> fue identificado en dos tipos de integrones: *Int1-bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA4-dfrB1-aadA1-catB2-qacEΔ1/sul1* (In624) e *Int1-bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA4-aadA1-qacEΔ1/sul1* (In488) que, a su vez, se asociaron a un plásmido conjugativo de gran tamaño (300 pb) perteneciente al grupo IncHI2. La secuenciación del genoma completo de la cepa EC\_38 confirmó los resultados obtenidos, además de, la detección de otros genes de resistencia a antibióticos que fueron concordantes con el fenotipo de resistencia que estaba expresando dicha cepa.

En el segundo estudio el objetivo fue estudiar la epidemiología molecular de los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a carbapenémicos y que emergieron en el Hospital Universitario 12 de Octubre durante 2009-2014. La carbapenemasa más frecuentemente identificada en la especie de *K. pneumoniae* fue OXA-48 (61%), seguida de VIM-1 (38%) y KPC-2 (1%). Durante los primeros años se detectaron aislamientos de *K.*

*pneumoniae* VIM-1 que presentaron una gran diversidad clonal y que fueron causantes de pequeños brotes localizados en servicios clínicos específicos del hospital, como la Unidad de Cuidados intensivos de Neonatología (UCIN) y el servicio de Nefrología. Estos brotes afectaron a pacientes adultos y pediátricos. Cuando se compararon las características de los pacientes colonizados/infectados por *K. pneumoniae* OXA-48 vs. VIM-1, se observó que los pacientes del primer grupo presentaban una tendencia a haber sido trasladados desde centros sociosanitarios (17,2% vs. 3,4%,  $p=0,069$ ). Por otra parte, los pacientes colonizados/infectados por *K. pneumoniae* VIM-1 ingresaron más frecuentemente en el servicio de Nefrología (44,8% vs. 1,8%;  $p < 0,001$ ), eran más frecuentemente receptores de trasplante de órgano sólido (63,9% vs. 36,4%;  $p < 0,001$ ) y presentaban con mayor frecuencia infecciones del tracto urinario (51,7% vs. 31,0%;  $p=0,062$ ).

En el año 2013 el escenario epidemiológico policlonal cambio hacia una diseminación clonal por parte del clon ST11 de *K. pneumoniae* OXA-48, el cual, desplazó a la mayoría de los clones de *K. pneumoniae* VIM-1. El estudio de tipificación molecular mostró la existencia de 20 patrones clonales que estuvieron circulando durante 2009 a 2014. De entre todos los clones destacó uno de ellos, denominado como clon J, que agrupó a la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* OXA-48 y que se propagó por todo el hospital persistiendo a día de hoy. Este clon fue identificado como ST11, pertenece al complejo clonal CC258 y es considerado como un clon de alto riesgo. La secuenciación del genoma completo de la cepa *K. pneumoniae* OXA-48 del clon ST11 reveló la presencia de 121 genes de resistencia a antibióticos, metales y biocidas, además de, una gran variedad de elementos genéticos móviles, entre ellos plásmidos (IncFIB, IncFII, IncL/M e IncR). El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> se encontró formando parte del transposón compuesto Tn1999 que, a su vez, se asoció a un plásmido IncL/M, denominado pKPOXA-48J1. Los únicos genes accesorios que estuvieron presentes en este plásmido correspondieron al transposón Tn1999 y al gen *bla*<sub>OXA-48</sub>, como único gen de resistencia.



En el tercer estudio el objetivo propuesto fue el de investigar los mecanismos implicados en la resistencia a los carbapenémicos y la presencia de EGMs asociados a los aislamientos de *C. freundii* multirresistentes que fueron detectados en el Hospital Universitario 12 de Octubre durante 2009 a 2014. En los 6 años de estudio se identificó un 2,1% de infecciones/colonizaciones causadas por *C. freundii* productores de carbapenemasas, siendo VIM-1 la carbapenemasa más prevalente, seguida de KPC-2. En algún caso se detectaron de forma simultánea dos genes de carbapenemasas, *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>KPC-2</sub>, en el mismo aislamiento. El estudio genómico permitió demostrar que las carbapenemasas detectadas, VIM-1 y KPC-2, estaban localizadas en plásmidos. Se identificaron hasta 7 tipos de replicones (IncFIA, IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncL/M, IncP) siendo el IncL/M el más frecuente. El gen *bla*<sub>VIM-1</sub> estaba asociado con el integrón In624, descrito previamente en nuestro hospital en los aislamientos de *E. cloacae* VIM-1. Además, 3 de los aislamientos de *C. freundii* VIM-1 fueron portadores de integrones complejos que se caracterizaron por presentar la secuencia de inserción ISCR1 y genes *qnr*, que codifican resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. La estructura poblacional de los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas presentó un patrón policlonal. Hubo dos aislamientos, CF\_1 (ST89) y CF\_4 (ST90), que se encontraron alejados del resto de cepas en el árbol filogenético y que fueron identificadas mediante las herramientas computacionales como *Citrobacter portucalensis*. Los dos aislamientos de *C. portucalensis* portadores de VIM-1 y KPC-2, respectivamente, fueron los primeros casos descritos hasta el momento.

En el cuarto estudio el objetivo fue estudiar la epidemiología molecular de los aislamientos de *E. cloacae* complex productores de NDM-7 durante 2016 a 2017. Durante este periodo se detectaron 3 casos de infecciones/colonizaciones por *E. cloacae* complex con fenotipo de multirresistencia y que portaban la carbapenemasa tipo NDM-7. Los pacientes afectados eran ancianos, presentaron diversas comorbilidades y ninguno de ellos había viajado fuera de España. Los aislamientos clínicos se identificaron inicialmente como *E.*

*cloacae* complex mediante MALDI-TOF y finalmente como *Enterobacter hormaechei* mediante la herramienta bioinformática JSpecies. El análisis genómico confirmó la detección de la carbapenemasa NDM-7 y otros genes de resistencia antibiótica que coincidieron con el fenotipo expresado por la cepa. Se identificaron 3 tipos de replicones plasmídicos (IncA/C, IncFIB e IncX3), siendo el plásmido IncX3, denominado pEH-NDM-7-JV, el que albergó el gen *bla*<sub>NDM-7</sub>. El entorno genético del gen *bla*<sub>NDM</sub> mostró que en el extremo 5' se localizaba la secuencia de inserción IS*Aba125* que se encontraba truncada y en el extremo 3' se encontraba el gen *ble*<sub>MBL</sub>. El análisis filogenético reveló que las tres cepas pertenecían al clon ST78 y que estaban estrechamente relacionadas por presentar menos de 75 SNPs de diferencia. Este clon representa a un clon de alto riesgo internacional que se ha identificado en diferentes partes del mundo.

En conclusión, esta tesis nos ha permitido estudiar la epidemiología molecular de las EPC más frecuentes en nuestro hospital y conocer los EGMs que albergaron genes de carbapenemasas y que favorecieron su diseminación entre las especies de *Enterobacterales*. Este estudio pone de manifiesto la problemática en relación a la resistencia a los antimicrobianos, que coincide con la situación epidemiológica actual. Por todo ello, es necesario conocer la epidemiología de cada hospital en relación con las especies y clones circulantes, los tipos de carbapenemasas y EGMs implicados en su diseminación para poder llevar a cabo una intensa vigilancia epidemiológica.

## **ABSTRACT**

The emergence and dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) species is a Public Health problem that has become a health care priority. Carbapenem resistance has been a great challenge for clinicians and professionals in charge of infection surveillance and control due to limitations in therapeutic treatments. The major mechanism of carbapenem resistance in *Enterobacterales* is carbapenemase production that is usually associated with mobile genetic elements (MGEs), which are responsible for carrying and transferring these genes between different *Enterobacterales* species.

The epidemiological situation in Spain has been getting worse in recent years. Currently, our country is in stage 4 of the European epidemiological scale, which means that most of the outbreaks detected have been associated with an inter-regional transmission. The carbapenemase OXA-48 has been identified as the most prevalent in most Spanish hospitals. Furthermore, it has been associated with a strain of *Klebsiella pneumoniae* ST11, which is considered a high-risk clone that has spread throughout the country. On the other hand, the VIM-1 enzyme is the second most frequent carbapenemase detected in *Enterobacterales*. It has given rise to sporadic outbreaks throughout the whole Spain, remaining constant in recent years.

Since the first case of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex was detected in the Hospital Universitario 12 de Octubre in 2007, there has been a significant increase in the isolation of different species of CPE that affected patients admitted to different hospital wards. Given the importance of carbapenemases as the main mechanism of resistance to carbapenemics in *Enterobacterales*, the major objective of this thesis was to study the molecular epidemiology of CPE isolates in the Hospital Universitario 12 de Octubre during a 10-year period (2007- 2017).

The first study aimed to characterize the molecular epidemiology of carbapenem-resistant *E. cloacae* clinical isolates during 2007-2012. During the 6 years of study 73 *E. cloacae* isolates were detected. Thirty-seven out of 73 isolates were VIM-1 positive; 5 isolates were KPC-2 positive and a single isolate was VIM-2 positive. Patients infected with VIM-1-producing *E. cloacae* isolates were more often admitted to the Nephrology ward and showed more frequently chronic renal insufficiency, urethral catheters and urinary tract infections. VIM-1-producing *E. cloacae* isolates showed high clonal diversity, which suggested that the dissemination of these isolates did not depend on the propagation of a single clone, but that the dissemination of the *bla*<sub>VIM-1</sub> gene was associated with the spread of different MGEs. The *bla*<sub>VIM-1</sub> gene was identified in two types of integrons: *IntI*–*bla*<sub>VIM-1</sub>–*aacA4*–*dfxB1*–*aadA1*–*catB2*–*qacEΔ1*/*suI1* (In624) and *IntI*–*bla*<sub>VIM-1</sub>–*aacA4*–*aadA1*–*qacEΔ1*/*suI1* (In488), which were associated with a large conjugative plasmid (300 bp) belonging to the IncHI2 group. The whole genome sequencing of EC\_38 strain confirmed the previously obtained results.

In the second study the objective was to determine the molecular epidemiology of the carbapenem-resistant *K. pneumoniae* clinical isolates that emerged in Hospital Universitario 12 de Octubre during 2009-2014. The most frequently identified carbapenemase in the *K. pneumoniae* species was OXA-48 (61%), followed by VIM-1 (38%) and KPC-2 (1%). During the first years, VIM-1-producing *K. pneumoniae* isolates presented a high clonal diversity and were the cause of small outbreaks located in different clinical services of the hospital, such as the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) and the Nephrology ward. These outbreaks affected adult and pediatric patients. No statistically significant differences were found between the clinical characteristics of infected/colonized patients by OXA-48 and VIM-1-producing *K. pneumoniae*. In general, it was observed that patients affected by OXA-48-producing *K. pneumoniae* were elderly patients who had been transferred from nursing homes (17,2% vs. 3,4%,  $p=0,069$ ), while patients infected/colonized by VIM-1-producing *K. pneumoniae* were more frequently admitted to Nephrology (44,8% vs. 1,8%;  $p < 0,001$ ), were solid organ

transplant recipients (63,9% vs. 36,4%;  $p < 0,001$ ) and presented more frequently with UTI (51,7% vs. 31,0%;  $p=0,062$ ).

In 2013 the polyclonal epidemiological scenario shifted towards a clonal dissemination by the OXA-48-producing *K. pneumoniae* ST11 clone, which displaced most of the clones of VIM-1-producing *K. pneumoniae*. The molecular typing study showed the existence of 20 clonal patterns that were circulating during 2009 to 2014. Clone J, which clustered most strains of OXA-48-producing *K. pneumoniae*, spread throughout the hospital and persists until today. This clone was identified as ST11, belonging to the 258 clonal complex (CC258) and being considered a high-risk clone. The whole genome sequencing of OXA-48-producing *K. pneumoniae* ST11 clone revealed the presence of 121 antibiotic, metal and biocidal resistance genes, in addition to a wide variety of MGEs, including plasmids (IncFIB, IncFII, IncL/M and IncR). The *bla*<sub>OXA-48</sub> gene was found to be part of the Tn 1999 compound transposon which was associated with an IncL/M plasmid, named pKPOXA-48J1. The only resistance gene present in this plasmid corresponded to the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene.

In the third study, the proposed objective was to investigate the mechanisms involved in carbapenems resistance and the presence of MGEs associated with the multidrug resistance (MDR) *C. freundii* isolates that were detected at the Hospital Universitario 12 de Octubre from 2009 to 2014. In the 6 years of the study, 2,1% of infections/colonizations caused by carbapenemase-producing *C. freundii* were identified, with VIM-1 being the most prevalent carbapenemase, followed by KPC-2. In some cases, two carbapenemase genes, *bla*<sub>VIM-1</sub> and *bla*<sub>KPC-2</sub>, were detected simultaneously in the same isolate. The genomic study showed that the detected carbapenemases, VIM-1 and KPC-2, were located in plasmids. Up to 7 types of replicons (IncFIA, IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncL/M and IncP) were identified with IncL/M being the most frequent. The *bla*<sub>VIM-1</sub> gene was associated with the integron In624, previously described in our hospital in the VIM-1-producing *E. cloacae* isolates. In addition, 3 of the VIM-1-producing *C. freundii* isolates were carriers of complex integrons that were

characterized by presenting the ISCR1 insertion sequence and *qnr* genes, which encode plasmid-mediated quinolone resistance. The population structure of the carbapenemase-producing *C. freundii* isolates presented a polyclonal pattern. Two isolates, CF\_1 (ST89) and CF\_4 (ST90), were found distant from the other strains in the phylogenetic tree and were identified by computational tools as *Citrobacter portucalensis*. These two isolates were the first cases of VIM-1 and KPC-2-producing *C. portucalensis* described so far.

In the fourth study, the objective was to determine the molecular epidemiology of the NDM-7-producing *E. cloacae* complex isolates during 2016 to 2017. During this period, 3 cases of infections/colonization by NDM-7-producing multi-drug resistant *E. cloacae* complex were detected. The three patients were elderly, had many comorbidities, and had never travelled outside of Spain. Clinical isolates were initially identified as *E. cloacae* complex by MALDI-TOF. Species level identification was then completed using the JSpecies bioinformatics tool as *Enterobacter hormaechei*. Genomic analysis confirmed the detection of carbapenemase NDM-7. Three types of plasmid replicons (IncA/C, IncFIB and IncX3) were identified. The *bla*<sub>NDM-7</sub> gene was located on a 45.122 bp IncX3 plasmid, named pEH-NDM-7-JV, inserted into an *IS26-dsbC-trp-ble*<sub>MBL</sub>-*bla*<sub>NDM-7</sub>-*ISAb*<sub>125</sub>-*IS5*-*ISAb*<sub>125</sub> genetic element. The phylogenetic analysis revealed that the three strains belonged to ST78 clone and were closely related (<75 SNPs). This clone represents a high-risk international clone that has been identified in different parts of the world.

In conclusion, this thesis has allowed us to study the molecular epidemiology of the most frequent CPE in our hospital and to identify the MGEs, which harbored carbapenemase genes that favored their dissemination among *Enterobacterales* species. This study highlights the problem of antimicrobial resistance, which correspond to the current epidemiological situation. Therefore, it is necessary to know the epidemiology of each hospital in relation to the species and circulating clones, the carbapenemases types and MGEs involved in their dissemination in order to perform a comprehensive epidemiological surveillance.

# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



1. **Villa J**, Viedma E, Otero JR, Chaves F. Draft Whole-Genome Sequence of VIM-1-Producing Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* EC\_38VIM1. *Genome Announc.* 2013;1(5):e00694-13. Published **2013** Sep 5. doi:10.1128/genomeA.00694-13.
2. **Villa J**, Viedma E, Brañas P, Orellana MA, Otero JR, Chaves F. Multiclonal spread of VIM-1-producing *Enterobacter cloacae* isolates associated with In624 and In488 integrons located in an IncHI2 plasmid. *Int J Antimicrob Agents.* **2014**;43(5):451-455. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.02.006.
3. **Villa J**, Viedma E, Brañas P, Mingorance J, Chaves F. Draft Whole-Genome Sequence of OXA-48-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* KP\_ST11\_OXA-48. *Genome Announc.* 2014;2(4):e00737-14. Published **2014** Jul 31. doi:10.1128/genomeA.00737-14.
4. Brañas P, **Villa J**, Viedma E, Mingorance J, Orellana MA, Chaves F. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *Int J Antimicrob Agents.* **2015**;46(1):111-116. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.02.019.
5. Brañas P, Gil M, **Villa J**, Orellana MÁ, Chaves F. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* infection/colonisation in a hospital in Madrid. Epidemiología molecular de las infecciones/colonizaciones por Enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2018**;36(2):100-103. doi:10.1016/j.eimc.2016.10.004.

6. **Villa J**, Arana DM, Viedma E, Perez-Montarelo D, Chaves F. Characterization of mobile genetic elements carrying VIM-1 and KPC-2 carbapenemases in *Citrobacter freundii* isolates in Madrid. *Int J Med Microbiol.* **2017**;307(6):340-345. doi:10.1016/j.ijmm.2017.07.001.
  
7. **Villa J**, Carretero O, Viedma E, Lora-Tamayo J, Mingorance J, Chaves F. Emergence of NDM-7-producing multi-drug-resistant *Enterobacter hormaechei* sequence type ST78 in Spain: a high-risk international clone. *Int J Antimicrob Agents.* **2019**;53(4):533 - 534. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.11.009.

## RELACIÓN DE TABLAS

**Tabla 1.** Recomendaciones de EUCAST para el cribado de carbapenemasas en *Enterobacterales* ([EUCAST versión 1.0, 11/12/2013](#)).

**Tabla 2.** Recomendaciones de EUCAST para el cribado de carbapenemasas en *Enterobacterales* ([EUCAST versión 2.0, 11/07/2017](#)).

**Tabla 3.** *Primers* y condiciones de PCR para la caracterización de los genes que codifican para carbapenemasas.

**Tabla 4.** *Primers* y condiciones de PCR para la realización de MLST de *K. pneumoniae*.

**Tabla 5.** *Primers* y condiciones de PCR para estudio de plásmidos mediante PBRT.

**Tabla 6.** Esquemas MLST.

**Tabla 7.** Cepas de *E. cloacae* (N=43) seleccionadas para su caracterización molecular.

**Tabla 8.** Cepas de *K. pneumoniae* (N=97) seleccionadas para su caracterización molecular.

**Tabla 9.** Cepas de *C. freundii* (N=11) seleccionadas para su caracterización molecular.

**Tabla 10.** Cepas de *E. hormaechei* (N=3) seleccionadas para su caracterización molecular.

**Tabla 11.** Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *E. cloacae* productores de carbapenemasas.

**Tabla 12.** Características clínicas de los pacientes infectados/colonizados por *E. cloacae*.

**Tabla 13.** Características Microbiológicas y Moleculares de los aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM-1.

**Tabla 14.** Resultados de clasificación plasmídica en función al grupo de incompatibilidad por PBRT de los aislamientos de *E. cloacae*.

**Tabla 15.** Perfil alélico por MLST de la cepa EC\_38VIM.

**Tabla 16.** Características fenotípicas y genotípicas de la cepa EC\_38VIM.

**Tabla 17.** Perfil de resistencia de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas.

**Tabla 18.** Características clínicas de los pacientes adultos infectados/colonizados por *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas.

**Tabla 19.** Relación del perfil alélico (MLST) y los patrones de PFGE en KPCC.

**Tabla 20.** Genes de resistencia a metales y biocidas de la cepa KP\_ST11\_OXA-48.

**Tabla 21.** Características fenotípicas y genotípicas de la cepa KP\_ST11\_OXA-48.

**Tabla 22.** Características microbiológicas y moleculares de los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas.

**Tabla 23.** Características de la secuenciación de los genomas de *C. freundii* productores de carbapenemasas.

**Tabla 24.** Caracterización de los genes de resistencia y los elementos móviles en los aislamientos de *C. freundii*.

**Tabla 25.** Mutaciones en los genes *gyrA/parC* y el perfil de resistencia a quinolonas en los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas.

**Tabla 26.** Características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos.

**Tabla 27.** Características de los genomas de los aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos productores de NDM-7 y descripción de las métricas del ensamblado y de anotación.

**Tabla 28.** Características de los genomas de las EPC y descripción de las métricas del ensamblado.

## RELACIÓN DE FIGURAS

**Figura-1.** Estructura de los carbapenémicos.

**Figura-2.** Entorno genético del gen *bla<sub>GES</sub>*.

**Figura-3.** Árbol filogenético UPGMA (*unweighted pair group method using average linkages*) de la carbapenemasa OXA-48 obtenida de especies de *Enterobacterales*.

**Figura-4.** Estructura del plásmido pOXA-48a IncL/M de un aislamiento de *K. pneumoniae*.

**Figura-5.** Estructura del transposón Tn4401.

**Figura-6.** Estructura del transposón Tn402/Tn5090.

**Figura-7.** Entorno genético del gen *bla<sub>NDM</sub>*.

**Figura-8.** Entorno genético del gen *bla<sub>OXA-48</sub>*.

**Figura-9.** Estructura de un Integrón sencillo de Clase 1.

**Figura-10.** Estructura de un Integrón compuesto de Clase 1.

**Figura-11.** Distribución global de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas.

**Figura-12.** Comparación de la situación epidemiológica de EPC en los países europeos entre los años 2010-2018.

**Figura-13.** Situación epidemiológica en Europa (Julio 2018, 37 países).

**Figura-14.** Estructura de un Integrón de Clase 1.

**Figura-15.** Estructura del integrón dirección *upstream* de *bla<sub>VIM-1</sub>*.

**Figura-16.** Estructura del integrón dirección *downstream* de *bla<sub>VIM-1</sub>*.

**Figura-17.** Evolución temporal de las infecciones/colonizaciones de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas en el H12O.

**Figura-18.** Distribución temporal de los casos de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas en el H12O incluidos en este estudio.

**Figura-19.** Distribución anual del N° de aislamientos de *E. cloacae* productores de carbapenemasa.

**Figura-20.** Dendrograma de *E. cloacae* productor de carbapenemasa VIM-1.

**Figura-21.** Panel A: PCR *upstream* de *bla<sub>VIM-1</sub>*. Panel B: PCR *downstream* de *bla<sub>VIM-1</sub>*.

**Figura-22.** Estructura del Integrón In624 ([GQ422827](#)).

**Figura-23.** Estructura del Integrón In488 ([GQ422826](#)).

**Figura-24.** Distribución temporal de los aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM-1 de acuerdo con los patrones electroforéticos y la estructura del Integrón.

**Figura-25.** Gel de electroforesis e hibridación de las cepas de *E. cloacae* productoras de VIM-1. A) Digestión del ADN con S1 nucleasa, B) Hibridación con la sonda VIM-1, C) Hibridación con la sonda IncHI2.

**Figura-26.** Distribución temporal de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos (KPRC) e incidencia durante el periodo de estudio.

**Figura-27.** Distribución temporal de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas.

**Figura-28.** Dendrograma basado en PFGE de los 94 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa.

**Figura-29.** Alineamiento del gen *ompK35* de la cepa KP\_ST11\_OXA-48.

**Figura-30.** Alineamiento del gen *ompK36* de la cepa KP\_ST11\_OXA-48.

**Figura-31.** Estructura del plásmido pKPOXA-48J1.

**Figura-32.** Dendrograma basado en PFGE de los 11 aislamientos de CFPC.

**Figura-33.** Valores de ANI para los genomas de *C. freundii* secuenciados.

**Figura-34.** Localización de los genes de resistencia basada en el análisis de ensamblado con plasmidSPAdes y plasmidFinder en los aislamientos de CFPC.

**Figura-35.** Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *gyrA* de los aislamientos de CFPC con la referencia *C. freundii* ([AB003913](#)).

**Figura-36.** Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *parC* de los aislamientos de CFPC con la referencia *C. freundii* ([AB003914](#)).

**Figura-37.** Entornos genéticos de los genes *bla<sub>VIM-1</sub>* y *bla<sub>KPC-2</sub>*.

**Figura-38.** Árbol filogenético basado en el análisis de SNPs de los 11 aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas. El genoma de referencia utilizado fue *C. freundii* CFNIHI ([CP007557](#)).

**Figura-39.** PFGE de los aislamientos de *E. cloacae* complex resistente a carbapenémicos productores de NDM-7 procedentes de los pacientes 1, 2 y 3 incluidos en el estudio.

**Figura-40.** Estructura del plásmido IncX3 pEH-NDM-7-JV.

**Figura-41.** Árbol filogenético basado en el análisis de SNPs de los 3 aislamientos de *E. hormaechei* productores de *bla<sub>NDM-7</sub>*.



## **ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Ácido dipicolínico
<b>AMK</b>	Amicacina
<b>ANI</b>	<i>Average nucleotide identity</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BLEE</b>	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido
<b>BWA</b>	<i>Burrows-Wheeler aligner</i>
<b>CAA</b>	Centro de Actividades Ambulatorias
<b>CARD</b>	<i>The Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
<b>CC</b>	Complejo clonal
<b>CF</b>	<i>Citrobacter freundii</i>
<b>CFPC</b>	<i>Citrobacter freundii</i> productor de carbapenemasa
<b>CDC</b>	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
<b>CDS</b>	<i>Coding sequence</i>
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentraciones Mínimas Inhibitorias
<b>CR</b>	<i>Common region</i>
<b>CST</b>	Colistina
<b>DOR</b>	Doripenem
<b>EC</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<b>ECC</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
<b>ECC-RC</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex resistente a carbapenémicos
<b>ECCOF</b>	<i>Epidemiological cut-off values</i>
<b>ECDC</b>	Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGMs</b>	Elementos genéticos móviles
<b>EH</b>	<i>Enterobacter hormaechei</i>

<b>EMAs</b>	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
<b>EPC</b>	<i>Enterobacterales</i> productores de carbapenemasas
<b>ERC</b>	<i>Enterobacterales</i> resistentes a carbapenémicos
<b>ETP</b>	Ertapenem
<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>FOS</b>	Fosfomicina
<b>GEN:</b>	Gentamicina
<b>H120</b>	Hospital Universitario 12 de Octubre
<b>In</b>	Integrones
<b>Inc</b>	Incompatibilidad plasmídica
<b>IHQ</b>	Infección de herida quirúrgica
<b>IPM</b>	imipenem
<b>IS</b>	<i>Insertion sequences</i>
<b>ITU</b>	Infección del tracto urinario
<b>KP</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa
<b>KPPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de carbapenemasa
<b>KPRC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos
<b>LB</b>	<i>Luria Bertani- Bouillon</i>
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i>
<b>MBL</b>	Metalo- $\beta$ -lactamasas
<b>MDR</b>	<i>Multi drug-resistant</i>
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>MH</b>	<i>Müller-Hinton</i>
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
<b>NAL</b>	Ácido nalidíxico
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>PBP</b>	<i>Penicillin binding protein</i>

<b>PBRT</b>	<i>PCR-based Replicon Typing</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
<b>PGAAP</b>	<i>Prokariotic Genomes Automatic Annotation Pipeline</i>
<b>QRDR</b>	<i>Quinolone resistance determining region</i>
<b>RAST</b>	<i>Rapid Annotations using Subsystems Technology</i>
<b>SGC</b>	Secuenciación de genoma completo
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>ST</b>	<i>Sequence type</i>
<b>SXT</b>	Trimetoprim/sulfametoxazol
<b>TGC</b>	Tigeciclina
<b>THM</b>	<i>Test Hodge Modified</i>
<b>TOB</b>	Tobramicina
<b>UCI-N</b>	Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
<b>UCI-P</b>	Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos
<b>UPGMA:</b>	<i>Unweighted pair group method using average linkages</i>
<b>VFDB</b>	<i>Virulence factors of pathogenic bacteria database</i>
<b>wgMLST</b>	<i>Whole Genome Multilocus Sequence Typing</i>
<b>XDR</b>	<i>Extensively drug-resistant</i>

# INTRODUCCIÓN

### 1. Generalidades sobre el orden *Enterobacterales*.

El orden *Enterobacterales* se encuentra clasificado dentro del dominio Bacteria, filo *Proteobacteria* y clase *Gammaproteobacteria*. La clasificación a nivel de familia ha sido recientemente revisada debido a los avances en secuenciación genómica. La nueva clasificación taxonómica incluye 7 familias (*Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* y *Budviciaceae*). Los principales géneros que se han visto modificados por la nueva clasificación son, *Hafnia*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* y *Yersinia*, que dejan de formar parte de la familia *Enterobacteriaceae* (1,2).

Los miembros del orden *Enterobacterales* son un grupo heterogéneo de bacilos Gram-negativos, que se caracterizan por ser bacterias no esporuladas, anaerobios facultativos, reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa con o sin formación de gas, muestran negatividad a la prueba de la oxidasa y pueden ser inmóviles o móviles por flagelos peritricos. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, aunque el principal nicho biológico es el tracto gastrointestinal de humanos y de animales, donde pueden permanecer como comensales o bien actuar como patógenos causando una gran variedad de enfermedades, como infecciones gastrointestinales, cistitis y pielonefritis, bacteriemia, neumonía, peritonitis, meningitis e infecciones asociadas a dispositivos médicos (3,4). Pueden ser adquiridas como infecciones de la comunidad o nosocomiales y son propensas a propagarse fácilmente de persona a persona a través de fómites, alimentos o agua contaminada. Estas especies se caracterizan por tener la capacidad de adquirir determinantes de resistencia y virulencia a través de la transferencia horizontal de material genético, fundamentalmente plásmidos y transposones y de diseminarse de forma eficiente por distintas regiones causando brotes (5).

### 2. La crisis mundial de la resistencia a los antibióticos.

En los últimos años la incidencia de las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos ha aumentado de manera importante para convertirse en una prioridad asistencial y de salud pública reconocida por las principales instituciones nacionales e internacionales: la Comisión Europea, el G7, el G20, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU. y la Organización Mundial de la Salud (OMS). De hecho, el problema es tan grave que, según las predicciones realizadas por la OMS, si la resistencia a los antibióticos continúa en aumento, las infecciones causadas por bacterias resistentes se convertirán en la principal causa de muerte en todo el mundo, por delante del cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (6–9).

La resistencia a los antimicrobianos ha supuesto un gran reto para los clínicos y los profesionales encargados de la vigilancia y control de las infecciones, debido a las limitaciones en el arsenal terapéutico. Inicialmente, los miembros del orden *Enterobacterales* suponían una amenaza para la salud pública por su capacidad de adquirir  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) que conferían resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Para combatir este problema se desarrollaron unos antibióticos de amplio espectro, denominados carbapenémicos, que se utilizaron como tratamiento de primera línea para este tipo de infecciones. Más tarde, el uso de los carbapenémicos condujo a un problema mayor, que fue la emergencia de bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenémicos, entre los que se incluyeron las especies del orden *Enterobacterales* (9). Por este motivo, la OMS estableció como máxima prioridad la lucha contra la resistencia a los antibióticos y en febrero de 2017 se publicó un listado de bacterias resistentes para las que se requería con urgencia el desarrollo de nuevos antimicrobianos. La lista estaba dividida en tres categorías (prioridad crítica, alta y media). Los miembros del orden *Enterobacterales* resistentes a

cefalosporinas de tercera generación y resistentes a los carbapenémicos se clasificaron dentro del grupo de prioridad crítica, junto con *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (6).

### 3. *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (ERC).

Las especies de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (ERC) fueron definidas inicialmente por los CDCs como aquellas bacterias resistentes a un único carbapenémico y a cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, en noviembre de 2015, esta definición fue revisada y actualizada, de tal forma que se consideró ERC a cualquier bacteria del miembro *Enterobacterales* que tuviera la capacidad de sobrevivir y crecer en presencia de concentraciones clínicamente relevantes de cualquier carbapenémico (imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem). Para aquellas especies que mantienen resistencia intrínseca a imipenem, como son *Proteus spp*, *Providencia spp* y *Morganella morganii* para ser reconocido como ERC se requiere la resistencia a otro carbapenémico. Por otro lado, se definió el concepto de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (EPC) en la que se refiere a la demostración de la producción de carbapenemasa por algún método de diagnóstico fenotípico o genotípico (10,11).

La incidencia y prevalencia de ERC ha aumentado drásticamente en todo el mundo lo que ha dado lugar a unas tasas elevadas de mortalidad atribuible que oscilan entre 6-20% (5,12). Los principales factores de riesgo que predisponen a adquirir una EPC se han asociado mayoritariamente a la utilización de antibióticos, al contacto con el ámbito hospitalario y con otros centros de cuidados sanitarios, a las estancias de hospitalización prolongadas, a la utilización de dispositivos médicos invasivos, a la colonización previa con otros microorganismos resistentes y, también, a las comorbilidades que presente el individuo (10). Además de los factores de riesgo tradicionales, se ha visto que viajar a zonas endémicas, ya

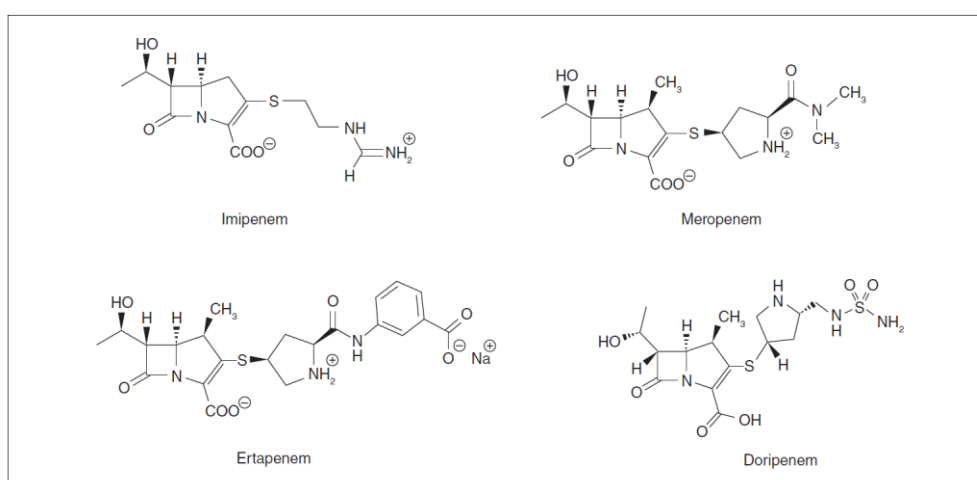


sea por visitas o por hospitalización en dicho país, también constituye un factor de riesgo importante a tener en cuenta (13).

## 4. Carbapenémicos.

### 4.1 Estructura química.

Los carbapenémicos son los antibióticos de elección para la mayoría de infecciones causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes, incluidas las especies de *Enterobacterales*. Forman parte de la familia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y tienen su origen en la obtención de tienamicina, un compuesto natural producido por la bacteria *Streptomyces cattleya*. La estructura química de los carbapenémicos consiste en un azabicyclo formado por la condensación de un anillo  $\beta$ -lactámico y un anillo pirrolidínico. En posición 1 hay un átomo de carbono (*carba*) y entre las posiciones 2-3 un enlace no saturado (*-em*), de ahí el nombre de carbapenem. Todos los carbapenémicos tienen en posición 6 un grupo hidroxietilo, que ofrece protección al anillo  $\beta$ -lactámico frente a las serin- $\beta$ -lactamasas, y en posición 3 hay un radical carboxilo cuya función es la activación del  $\beta$ -lactámico. Las diferentes moléculas de carbapenémicos han ido surgiendo como consecuencia de las sustituciones en las posiciones 1 y 2. (Figura-1) (14).



**Figura-1.** Estructura de los carbapenémicos (Adaptación de *Fresnadillo Martínez y cols.*, 2010, (14)).

### 4.2 Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de la pared celular de la bacteria durante la etapa de transpeptidación mediante la unión covalente a un residuo de serina en el centro activo de un tipo de peptidasas, que están situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática, y que se denominan proteínas fijadoras de penicilinas o PBPs (del inglés, *Penicillin Binding Protein*). Se consideran antibióticos bactericidas porque la pared celular se debilita y termina produciendo la lisis de la bacteria. Los carbapenémicos muestran una gran afinidad por las PBPs (especialmente las PBPs 1a, 1b, 2 y 3) en Gram-negativos. Este hecho ha dado lugar a que los carbapenémicos tengan diferente actividad intrínseca y diferente potencia antimicrobiana. La unión a la PBP-2 provoca cambios morfológicos en la célula de la bacteria dando lugar a células esféricas, y la unión a PBP-3 a formas filamentosas (14).

Los carbapenémicos son los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que presentan un mayor espectro bacteriano y se van a diferenciar por su estabilidad, por su actividad intrínseca, por su capacidad de inhibir o inducir  $\beta$ -lactamasas y por su capacidad de resistir a la acción de las  $\beta$ -lactamasas. Estas características han permitido clasificar a los carbapenémicos en tres grupos:

- **Grupo I (ertapenem y panipenem)**

Presentan una actividad limitada para bacilos Gram-negativos no fermentadores y son adecuados para el tratamiento de las infecciones adquiridas en la comunidad. Ertapenem se ha indicado para el tratamiento empírico de infecciones intrabdominales, de partes blandas y neumonías causadas por *Enterobacterales* productoras de BLEEs.

- **Grupo II (biapenem, doripenem, imipenem y meropenem)**

Presentan actividad antipseudomónica y frente a otros bacilos Gram-negativos no fermentadores. Son adecuados para tratar infecciones graves polimicrobianas adquiridas en el ámbito hospitalario.

- **Grupo III (razupenem, PTZ601)**

Mantiene actividad para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Actualmente, los carbapenémicos más utilizados en la práctica clínica son meropenem, imipenem y ertapenem (4,12).

### 4.3 Mecanismo de resistencia a carbapenémicos.

Se han descrito tres mecanismos de resistencia a carbapenémicos para los miembros del orden *Enterobacterales*, que son la producción de  $\beta$ -lactamasas de tipo BLEE o AmpC asociadas a la pérdida de porinas, la expresión de bombas de eflujo y la hidrólisis enzimática mediante las llamadas carbapenemasas (4,9,15).

#### 4.3.1 Porinas.

Las porinas son proteínas localizadas en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas que forman canales hidrofílicos y permiten el flujo pasivo de nutrientes y de otros compuestos como los antibióticos. En bacterias Gram-negativas se han descrito diferentes tipos de porinas según su actividad (específica o no específica de sustrato), estructura funcional (monomérica o trimérica), regulación y expresión. La mayoría de las porinas que están involucradas en el transporte de antibióticos en los microorganismos Gram-negativos pertenecen a las subfamilias *ompF* y *ompC*.

Algunos cambios en la estructura y en la expresión de las porinas se han relacionado con la resistencia a los antibióticos en *Enterobacterales*. Los antibióticos que se han visto más afectados por estas modificaciones son los  $\beta$ -lactámicos y las fluoroquinolonas. Un estudio realizado con aislamientos de *K. pneumoniae* que habían sido seleccionados durante el tratamiento con antibióticos del paciente confirmó que presentaban modificaciones en la permeabilidad de la membrana. En la mayoría de las cepas se comprobó que la porina *ompK35* (familia *ompF*), de un tamaño de poro mayor, fue reemplazada por la porina *ompK36* (familia *ompC*), que tenía un tamaño de poro menor. Esta observación demostró que durante la antibioterapia existió una modificación estructural que afectó a la entrada del antibiótico al interior de la célula (16). Otro estudio realizado en Taiwán demostró que la pérdida de porinas *ompK35* y *ompK36* en un aislamiento de *K. pneumoniae* combinada con la expresión de BLEEs del tipo *bla*<sub>CTX-M-15</sub> daba lugar a un aumento en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de ertapenem, meropenem y doripenem, lo cual confería resistencia a estos antibióticos en ausencia de producción de carbapenemasas (17).

### 4.3.2 Bombas de expulsión.

Son estructuras proteicas que se localizan en la membrana externa de las bacterias y que se encargan de expulsar al exterior gran cantidad de moléculas tóxicas mediante un co-transporte activo de iones que depende de la hidrólisis de ATP. La finalidad de este mecanismo es mantener bajas concentraciones de estas sustancias tóxicas en el interior de la célula. Son un mecanismo de resistencia común en Gram-negativos y, en concreto, en los miembros del orden *Enterobacterales*. Pueden ser específicas para un antibiótico (codificadas en plásmidos) o inespecíficas (codificadas en el cromosoma bacteriano). Uno de los mecanismos más comunes en *Enterobacterales* y otras bacterias Gram-negativas es el sistema AcrAB-TolC que puede dar lugar a la aparición de resistencia cruzada a antibióticos de diferentes familias (4).

### 4.3.3 Hidrólisis enzimática: Carbapenemasas.

La producción carbapenemasas es el mecanismo más frecuente de resistencia a carbapenémicos de los miembros del orden *Enterobacterales*. Las carbapenemasas son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico dando lugar a la inactivación del antibiótico carbapenémico. Existen dos clasificaciones que agrupan a las carbapenemasas:

#### **Clasificación de Ambler (clasificación molecular)**

En 1980, Ambler clasificó a las  $\beta$ -lactamasas en 4 grupos (A, B, C, D) en función de la composición de la secuencia de aminoácidos presentes en su sitio activo y de la preferencia de sustrato. Las carbapenemasas se incluyeron dentro de los grupos A (penicilinasas), B (metalo- $\beta$ -lactamasas o MBL) y D (oxacilinasas). Las carbapenemasas de clase A y D contienen un aminoácido de serina en su sitio activo que dará lugar a la formación de un éster de serina en la reacción de hidrólisis, mientras que, las  $\beta$ -lactamasas de la clase B contienen uno o dos átomos de  $Zn^{+2}$  en su centro activo que facilita la catálisis del sustrato (18).

#### **Clasificación de Bush y Medeiros (clasificación funcional)**

Esta clasificación agrupa a las  $\beta$ -lactamasas según su función en tres grupos principales: grupo 1 (cefalosporinasas), grupo 2 (penicilinasas, cefalosporinasas e inhibidores de BLEEs) y grupo 3 (MBL). Las carbapenemasas se encuentran incluidas en los grupos 2f (clase A), 2df (clase D) y grupo 3 (clase B) (19,20).

#### **A. Carbapenemasas de clase A.**

Las carbapenemasas de clase A se caracterizan por hidrolizar a la mayoría de  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos) y por ser inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico, tazobactam y avibactam (20–22).

La primera carbapenemasa de clase A fue detectada en 1982 en un aislamiento de *Serratia marcescens* en Reino Unido y fue denominada como *bla*<sub>SME-1</sub> ("*Serratia marcescens* *enzyme*") (23). Existen 5 variantes de este gen (SME-1 a SME-5) (24). Posteriormente, en 1996 se descubrió la  $\beta$ -lactamasa que hidroliza imipenem o imipenemasa, conocida como IMI ("*Imipenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase*") en un aislamiento de *Enterobacter cloacae* en EE. UU. (25). Las carbapenemasas tipo IMI son poco frecuentes y únicamente se han descubierto 6 variantes hasta la fecha (IMI-1 a IMI-6). La mayoría de los aislamientos portadores de esta enzima pertenecen al género *Enterobacter spp.* y de manera excepcional a *Escherichia coli* (26,27). La variante IMI-1 fue localizada en el cromosoma bacteriano, sin embargo, la variante IMI-2, que surgió por una mutación puntual, fue localizada en un plásmido. La expresión del gen *bla*<sub>IMI</sub> está controlada por un regulador transcripcional denominado LysR que está codificado por el gen *bla*<sub>IMI-R</sub> y que se localiza en posición adyacente al gen *bla*<sub>IMI</sub>. En el entorno genético del gen *bla*<sub>IMI</sub> se han identificado unas secuencias transponibles que flanquean el complejo *bla*<sub>IMI-R</sub>-*bla*<sub>IMI-1</sub>, y que se han relacionado con la movilización de este gen al plásmido (27). Por otro lado, en 1990 se publicó el primer caso de *E. cloacae* productor de carbapenemasa NmcA ("*not-metallo-enzyme-carbapenemase A*") en Francia. Esta enzima difiere de *bla*<sub>IMI-1</sub> y *bla*<sub>IMI-2</sub> en ocho sustituciones de aminoácidos y posee un regulador LysR del tipo que regula la expresión de *bla*<sub>IMI</sub> (25).

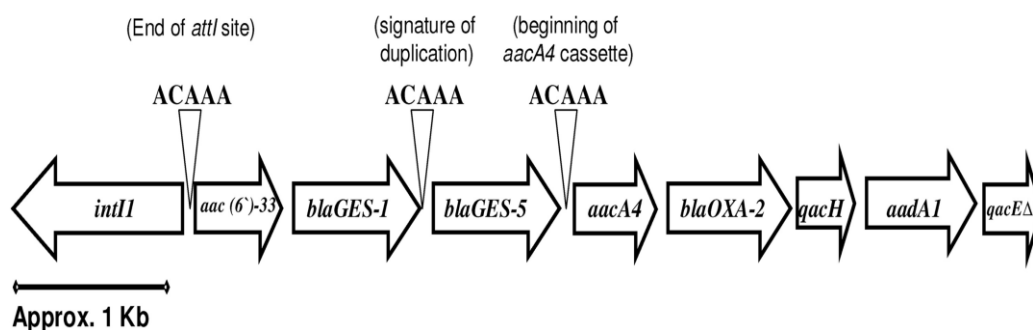
Otras carbapenemasas de clase A que son menos frecuentes y de codificación cromosómica son el gen *bla*<sub>SFC-1</sub>, obtenido de una cepa ambiental de *Serratia fonticola* aislada en Portugal, y el gen *bla*<sub>SHV-38</sub> obtenido de la cepa *K. pneumoniae* aislada en Francia y que difiere de la  $\beta$ -lactamasa *bla*<sub>SHV-1</sub> en una única sustitución de aminoácido (28).

Todas las carbapenemasas de clase A anteriormente descritas están codificadas en el cromosoma bacteriano. Existen dos tipos de carbapenemasa, las de tipo GES ("*Guiana extended spectrum*") y tipo KPC ("*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*"), que suelen estar

asociadas a plásmidos y que son las más importantes desde el punto de vista de la práctica clínica (12,24).

### Tipo GES

La primera variante del gen *bla*<sub>GES</sub> fue descubierta en 1998 y se caracterizó por no tener actividad carbapenemasa (29). Actualmente, existen 24 variantes de GES y todas ellas poseen la capacidad de hidrolizar a las cefalosporinas de amplio espectro. Algunas mutaciones en el centro activo de la enzima dieron lugar a las variantes con capacidad de hidrolizar a los carbapenémicos (GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14, GES-16 y GES-18), que son detectadas con menor frecuencia pero que, se han documentado en todo el mundo (29). La variante GES-2 ha sido detectada en *P. aeruginosa* en Sudáfrica (30), la variante GES-5 fue identificada en *Enterobacterales* y en *P. aeruginosa* en Brasil y en España (31,32), las variantes GES-11 y GES-14 sólo se ha identificado en *A. baumannii* (33) y la variante GES-18 en *P. aeruginosa* y no en *Enterobacterales* (34). Las enzimas tipo GES suelen estar frecuentemente localizadas en integrones de clase 1 formando parte de *cassettes* génicos que, a su vez, están asociadas a plásmidos transferibles (21,25). Sin embargo, existen algunos casos donde el *cassette* génico portador del gen *bla*<sub>GES</sub> se ha insertado en el cromosoma bacteriano (Figura-2) (32,35,36).



**Figura-2.** Entorno genético del gen *bla*<sub>GES</sub> (Adaptación de Viedma y cols., 2009, (32)).

### Tipo KPC

Es la carbapenemasa de clase A más frecuentemente descrita en los miembros del orden *Enterobacterales* y se diferencia de otras serin-carbapenemasas por tener una gran capacidad de hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos, lo que le confiere altos niveles de resistencia en ausencia de cambios en la permeabilidad de la membrana o de expresión de BLEEs (37). Se detectó por primera vez en 1996 en EE. UU., a partir de un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos. (38). Hasta el momento, hay descritas 20 variantes y todas ellas surgieron por mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos (24). Las variantes KPC-2 y KPC-3, que difieren en un único aminoácido, son las más frecuentes y suelen asociarse fundamentalmente a la especie de *K. pneumoniae*. Sin embargo, en los últimos años se han descrito casos de KPC en otras especies de *Enterobacterales* como, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella oxytoca*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *M. morganii* y *Citrobacter freundii*, entre otros (12,39,40).

Los genes *bla<sub>KPC</sub>* suelen estar asociados al transposón Tn4401 (familia Tn3) y se han encontrado en gran variedad de plásmidos transferibles de los grupos de incompatibilidad InFIIK, IncA/C, IncN, IncI2, IncX, IncR e ColE (41,42). Este hecho, ha facilitado su rápida diseminación a nivel mundial (43–45). EE. UU. es el país donde se han documentado la mayoría de los casos y suelen estar asociados a brotes hospitalarios que han sido originados por la transmisión de paciente a paciente por cepas pertenecientes al mismo complejo clonal (12). Las variantes KPC-2 y KPC-3 han sido descritas en diferentes complejos clonales de *K. pneumoniae* (ST258, ST11, ST101), que son considerados clones de alto riesgo responsables de la diseminación de este tipo de resistencia a nivel mundial (12).



### B. Carbapenemasas de clase B.

Las carbapenemasas de clase B o MBL se caracterizan por tener la capacidad de hidrolizar a todos los  $\beta$ -lactámicos, excepto a las monobactamas, como el aztreonam, y por conferir un alto nivel de resistencia cuando se combina con cambios en la permeabilidad de la membrana y con la expresión de BLEEs. A diferencia de las carbapenemasas de clase A y D, las MBLs contienen uno o dos átomos de  $Zn^{+2}$  en su centro activo lo que le confiere la ventaja de ser inhibidas por los quelantes metálicos como, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido dipicolínico (ADP) y resistir a la acción del ácido clavulánico u otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas usados en la práctica clínica (46). Las MBLs se subdividen en tres subclases (B1, B2, B3) dependiendo de la secuencia de aminoácidos y las características estructurales del sitio activo de la enzima. Las subclases B1 y B3 presentan dos iones de  $Zn^{+2}$  en el sitio activo que dan lugar a un espectro de hidrólisis mayor. La subclase B2 únicamente tiene un ion  $Zn^{+2}$  y sólo muestra actividad frente a carbapenémicos (47).

Las primeras MBLs que se estudiaron fueron detectadas en el medio ambiente y en el cromosoma de especies de patógenos oportunistas como *Bacillus cereus* (*BclI*), *Bacteroides fragilis* (*CcrA*), *Aeromonas hydrophila* (*CphA*) y *Stenotrophomonas maltophilia* (L1) (21,48,49). Afortunadamente, a excepción de *S. maltophilia*, estas bacterias no se han asociado con infecciones nosocomiales graves ya que no son patógenos oportunistas frecuentes y los genes codificados en el cromosoma no se transfieren tan fácilmente (21).

Las MBLs más importantes desde el punto de vista epidemiológico son las de tipo IMP ("*Imipenem-resistant Pseudomonas*"), VIM ("*Verona integron encode metallo- $\beta$ -lactamase*"), y NDM ("*New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*"), que con frecuencia se encuentran asociadas a elementos genéticos móviles (EGMs), del tipo integrones, transposones o plásmidos, y que presentan una elevada capacidad de diseminación (21). Otras MBLs menos frecuentes y que

son causantes de algún caso esporádico son GIM-1 ("German imipenemase"), SIM ("Seoul imipenemase"), AIM ("Adelaide imipenemase"), DIM ("Dutch imipenemase") y KHM-1 ("Kyorin University Hospital imipenemase") (47,50,51).

### Tipo IMP

La IMP fue la primera MBL identificada en *Enterobacterales* y se encontró en un aislamiento de *S. marcescens* en 1991 en Japón (52). Esta familia está formada por 48 variantes y se han descrito frecuentemente en China, Japón y Australia (5,24). Se ha detectado principalmente en aislamientos de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* y en algunos miembros del orden *Enterobacterales* incluidos, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae*, *Citrobacter spp.* (27). Estas enzimas suelen incluirse como *cassettes* génicos, junto con otros genes de resistencia a los antibióticos, y forman parte de integrones de clase 1, aunque se han descrito casos esporádicos asociados a integrones de clase 3. Estos integrones a menudo están incluidos en transposones y plásmidos conjugativos que están favoreciendo la diseminación entre las especies bacterianas (27). Entre 2009 y 2014, la variante del gen *bla*<sub>IMP-4</sub> fue la carbapenemasa más comúnmente encontrada en los hospitales de Australia y *E. cloacae* fue la especie más frecuente. El gen *bla*<sub>IMP-4</sub> se asoció a un plásmido conjugativo perteneciente al grupo de incompatibilidad IncHI2 y demostró ser la causa de la diseminación en toda la región (53).

### Tipo VIM

La familia VIM incluye más de 40 variantes que han sido identificadas principalmente en *P. aeruginosa* y *Enterobacterales*. Las variantes VIM-1 y VIM-2 son las más frecuentes y han sido documentadas por todo el mundo debido a su fácil y rápida diseminación (47). La enzima VIM-1 se detectó por primera vez en Italia en 1997 en Verona y VIM-2 se detectó en Francia en 1996 en un aislamiento de *P. aeruginosa* (21,28,54). VIM-2 es más frecuente que VIM-1 y ha sido descrita en la mayoría de los casos en aislamientos de *P. aeruginosa*, mientras que

VIM-1 es más común en *Enterobacterales*. Se han descrito casos en más de 17 países, siendo más frecuente en África y Europa. De entre los miembros del orden *Enterobacterales*, *K. pneumoniae* es la especie más frecuente que se asocia con la carbapenemasa VIM, seguido de *E. cloacae*, *C. freundii* y *E. coli* en Grecia, España y Alemania y República Checa y su diseminación entre las especies de *Enterobacterales* suele ser policlonal (55,56).

La enzima de tipo VIM es la MBL, asociada a EGMs, más prevalente a nivel mundial. El gen *bla*<sub>VIM</sub> está asociado con frecuencia a integrones de clase 1 y están formando parte de transposones (55,57). Inicialmente, se describieron algunos casos en los que el gen *bla*<sub>VIM</sub> se localizó en plásmidos del grupo de incompatibilidad IncN. Sin embargo, más tarde también se han descrito en otro tipo de plásmidos conjugativos (IncA/C, IncR, IncHI2, IncI1 e IncW) e incluso se han localizado en el cromosoma bacteriano (27,41).

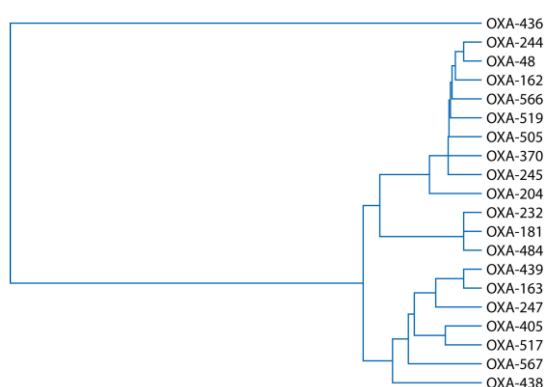
### Tipo NDM

Se detectó por primera vez en 2008 en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* procedente de un paciente sueco con infección del tracto urinario y que había sido previamente hospitalizado en New Delhi, India (58). A partir de 2010, la enzima NDM, que se consideró endémica de Asia, se diseminó rápidamente por todo el mundo a consecuencia del fenómeno de migración, dando lugar a casos en Canadá, China, Europa, Japón, África, Australia y EE. UU. (12,59). Se ha detectado principalmente en miembros del orden *Enterobacterales* y algunos casos en *Acinetobacter spp* (27). En la actualidad, se han descrito 16 variantes de esta enzima y la más frecuente es NDM-1. En *Enterobacterales*, suele estar asociado a plásmidos conjugativos heterogéneos de diferentes tamaños y que pertenecen a diversos grupos de incompatibilidad plasmídica (IncL, IncA/C, IncF e IncHI1) (41).

### C. Carbapenemasas de clase D.

Las carbapenemasas de clase D se denominan oxacilinasas (OXA, “*oxacillin-hydrolysing*”) por su capacidad de hidrolizar la oxacilina y las penicilinas (amino, carboxi y ureidopenicilinas). El perfil de hidrólisis de los carbapenémicos y de las BLEEs es más débil y no son inhibidos por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam), por el ácido borónico ni por EDTA, lo que dificulta su detección a nivel de laboratorio. Sin embargo, hay una característica que les diferencia de las carbapenemasas de clase A y B y es la elevada resistencia a temocilina (12,60).

Existen más de 200 variantes del gen *bla*<sub>OXA</sub>, algunas de las cuales presentan actividad carbapenemasa y están divididas filogenéticamente en dos grupos. El grupo I está presente principalmente en *A. baumannii* e incluye, a su vez, cuatro subgrupos: la) OXA-23, lb) OXA-24/40, lc) OXA-51 y ld) OXA-58. El grupo II está formado por las variantes relacionadas con OXA-48 que son detectadas principalmente en *Enterobacterales*, presentan una identidad en la secuencia de aminoácidos del 87% y están dentro del grupo denominado carbapenemasas “OXA-48-like” (Figura-3) (60).



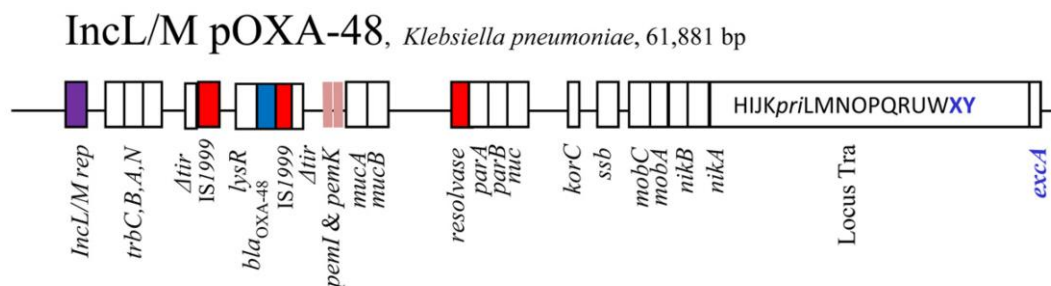
**Figura-3.** Árbol filogenético UPGMA (*unweighted pair group method using average linkages*) de la carbapenemasa “OXA-48-like” obtenida de especies de *Enterobacterales* (Adaptación de Pitout y cols., 2019, (61)).

### Tipo OXA-48.

La variante *bla*<sub>OXA-48</sub> fue identificada por primera vez en un aislamiento de *K. pneumoniae* en 2001 en Turquía (62). A partir de este momento, los *Enterobacterales* productores de OXA-48 son la principal causa de resistencia a los carbapenémicos y se han convertido en un gran problema a nivel mundial. De hecho, a lo largo de estos últimos años se han ido documentado casos en Israel, Senegal, Países Bajos, España, Irlanda y Eslovenia (63–67). En algunos casos, la introducción de casos esporádicos de *Enterobacterales* productores de OXA-48 han dado lugar a brotes nosocomiales de una gran magnitud, como es el caso de Francia, Bélgica, Irlanda y España (66,68–71).

El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> ha sido detectado de forma más frecuente en *K. pneumoniae* y se ha vinculado mayoritariamente a infecciones asociadas a los cuidados sanitarios. Además de *K. pneumoniae* se han documentado otros casos de *Enterobacterales* productores de OXA-48, entre los que se incluyen las especies de, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Proteus mirabilis*, *K. oxytoca* y *Providencia rettgeri* (60,72–76). La carbapenemasa OXA-48 se caracteriza por estar integrada en el Tn1999 y por asociarse a un plásmido de 62.5 kb perteneciente al grupo de incompatibilidad IncL/M, denominado pOXA-48a (Figura-4) (77). Recientemente, se han realizado análisis moleculares que han dividido los plásmidos del grupo IncL/M en subgrupos (IncL, IncM1, IncM2). Los plásmidos del grupo IncL son similares al plásmido pOXA-48a y se caracterizan porque no suelen contener otros genes de resistencia a antibióticos, que es lo que les diferencia de los plásmidos de los subgrupos IncM1 e IncM2. Los plásmidos IncL son conjugativos y han sido descritos en diferentes miembros del orden *Enterobacterales* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*) (77–79). Presentan una alta tasa de transmisibilidad que se debe fundamentalmente a que el gen *tir*, que codifica una proteína que inhibe la conjugación plasmídica, se encuentra truncado por la inserción del Tn 1999, dando lugar a un incremento

en la frecuencia de conjugación plasmídica y a una eficiente diseminación de *bla*<sub>OXA-48</sub> (60,77,78).



**Figura-4.** Estructura del plásmido pOXA-48a IncL/M de un aislamiento de *K. pneumoniae* (Adaptación de Carrër y cols., 2010, (78)).

#### 4.4 EGMs asociados a carbapenemasas en *Enterobacterales*.

La gran mayoría de carbapenemasas están asociadas a EGMs que participan en los fenómenos de transferencia horizontal, lo que ha supuesto un gran problema ya que han facilitado su diseminación entre los miembros del orden *Enterobacterales*. Además, con frecuencia las EPC presentan corresponsencia a otras familias de antibióticos no  $\beta$ -lactámicos, por lo que es cada vez más habitual la detección de casos de cepas que son resistentes a todos los antibióticos disponibles en la práctica clínica. Los principales EGMs que participan en la transmisión de genes de resistencia en *Enterobacterales* son las secuencias de inserción, los integrones, los transposones y los plásmidos. Se ha definido el concepto de “moviloma” para definir al conjunto de elementos auto-transferibles que participan en la transferencia de determinantes de resistencia de una célula a otra. Por otro lado, el concepto de “resistoma” se refiere al conjunto de genes que confiere resistencia a los antibióticos (80).

### 4.4.1 Secuencias de inserción (IS, “*Insertion Sequences*”).

Las IS son EGMs de tamaño pequeño (menos de 2.5 kb) que tienen la capacidad de transponerse de forma independiente y suelen ir asociadas a uno o dos genes de transposasa (*tnp*). Su estructura es sencilla, consiste en una secuencia que codifica a la Tnp, que les permite promover su propia transposición e integrarse en sitios específicos, y una proteína reguladora que permite o inhibe la transposición. Las IS van flanqueadas por unas secuencias repetidas invertidas (IRL, “*inverted repeat left*” y IRR, “*inverted repeat right*”) que son idénticas, sin embargo, se encuentran dispuestas en orientación inversa, una en cada hebra, dando lugar a un eje de simetría entre ellas. Tradicionalmente, las IS no se consideraban elementos transportadores de genes, sin embargo, estas estructuras pueden movilizar genes de resistencia cuando están formando parte de un transposón compuesto (57,81). Existen distintas nomenclaturas para referirse a las IS. Una de las más utilizadas es nombrar con las siglas IS seguidas de un número (IS1, IS2, IS3). La otra forma consiste en añadir las iniciales de la especie bacteriana en la que se aisló la IS (IS*Aba1*, *Acinetobacter baumannii*) (81).

Algunos tipos de IS se han visto involucradas en la movilización de carbapenemasas. Entre ellas se incluyen, la IS*Aba125* asociada a Tn125 para movilizar a *bla*<sub>NDM</sub>, la IS1999 asociada a Tn1999 para movilizar *bla*<sub>OXA-48</sub> y la IS*Aba1* asociada a Tn2006 para movilizar *bla*<sub>OXA-23</sub> y *bla*<sub>OXA-237</sub> (57).

### 4.4.2 Transposones.

Los transposones son segmentos de ADN de mayor tamaño que las IS y carecen de función autorreplicativa. Su estructura está basada en un sistema modular que suele ir flanqueado en sus extremos por unas secuencias repetidas invertidas, además de contener un gen que codifica una transposasa y otro gen interno que puede codificar resistencia a los antibióticos.

Los transposones tienen la capacidad de moverse de un sitio a otro dentro de una misma molécula de ADN o de una molécula de ADN a otra (82). La movilización de un transposón se conoce como transposición, y a la enzima que codifica y facilita este mecanismo, se la conoce como transposasa. Existen dos mecanismos fundamentales de transposición:

- No replicativo: mecanismo más conservador que se basa en escindir un elemento para, posteriormente, insertarlo en un lugar diferente.
- Replicativo: basado en la inserción de un elemento que previamente ha sido replicado.

En ambos mecanismos la transposasa reconoce determinadas IR que están localizadas en los extremos del transposón, corta la secuencia donadora y después inserta el fragmento en la secuencia de ADN receptora dando lugar a un genoma mixto al que se le denomina “cointegrado” (57).

### **A. Familia Tn3.**

Los genes de resistencias a los antimicrobianos suelen asociarse con transposones de la familia Tn3. La estructura del Tn3 se caracteriza por estar flanqueada por una IR de 38 pb, con IRL e IRR y por codificar el gen de una transposasa (TnpA) y otro gen que codifica para una resolvasa (TnpR). La TnpA es la enzima que promueve la transposición y la que genera cortes en el ADN diana y en el transposón. Después, la TnpA es capaz de ligar los extremos de los cortes generados para crear un “cointegrado”, genoma mixto generado por el mecanismo de transposición replicativa. La TnpR tiene dos funciones, por un lado, actúa como represor de la transcripción de la transposasa, y, por otro lado, es capaz de escindir los cointegrados a través de un proceso de recombinación específica de sitio (57).



Los miembros de la familia Tn3 (Tn1, Tn2, Tn3) fueron los primeros transposones identificados en Gram-negativos y dentro de esta familia se encuentra el Tn4401.

### Tn4401

El Tn4401 es uno de los transposones más estudiados por sus implicaciones en la diseminación de la resistencia a carbapenémicos. Se ha relacionado con la movilización del gen *bla*<sub>KPC</sub> (Figura-5).



**Figura-5.** Estructura del transposón Tn4401.

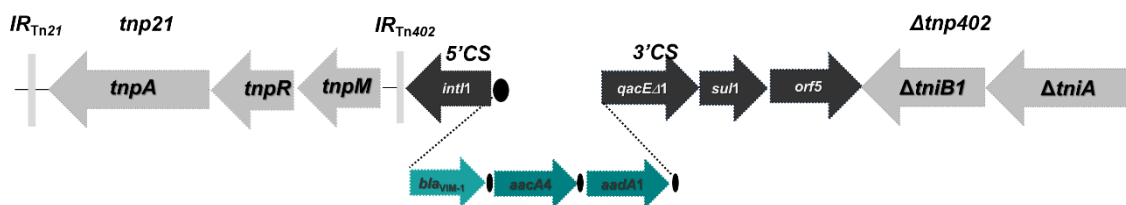
La secuencia de Tn4401 está flanqueada por la ISKpn7 (dirección *upstream*) y por ISKpn6 (dirección *downstream*). Se han descrito algunas variantes de Tn4401 que se distinguen por algunas deleciones que ocurren en el interior del transposón. Entre ellas, cabe destacar la variante de mayor longitud que es Tn4401b que tiene dos promotores (P1 y P2) que impulsan la expresión del gen *bla*<sub>KPC</sub>. Las variantes Tn4401a y Tn4401d contienen deleciones que mantienen a los dos promotores intactos y que dan lugar a niveles mayores de resistencia. En el caso de las variantes Tn4401c y Tn4401e contienen deleciones que únicamente mantienen el P2 dando lugar a una menor expresión del gen *bla*<sub>KPC</sub> (57).

## B. Familia Tn7.

La familia Tn7 está relacionada con la movilización de genes de carbapenemasas. Dentro de esta familia se encuentra el transposón tipo Tn402, actualmente Tn5090, el Tn125 relacionado con la movilización del gen *bla*<sub>NDM</sub> y el Tn1999 que moviliza al gen *bla*<sub>OXA-48</sub>.

### Tn402/Tn5090

Es uno de los transposones más estudiados. Se caracteriza por ir asociado a integrones de clase 1 y se ha relacionado con la movilización de VIM-1 en nuestra región (Figura-6) (55).

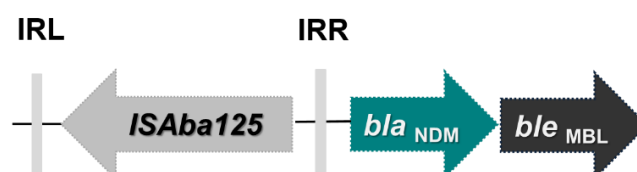


**Figura-6.** Estructura del transposón Tn402/Tn5090.

Esta familia de transposones contiene un grupo de genes de transposición, conocidos como “módulo *tniABQR*”, un sitio *res* (sitio de unión a la resolvasa) y una pareja de IR (25 pb) que se encuentra cerrando la estructura del transposón. Además, los miembros de esta familia suelen llevar asociado un operón *mer*, que les confiere resistencia a compuestos de mercurio y suele formar parte de Tn21 (57,83).

### Tn125

La movilización del gen *bla*<sub>NDM</sub> está vinculada al transposón Tn125 que, a su vez, va asociado con la *IS*Aba125. El entorno genético del gen *bla*<sub>NDM</sub> que se ha descrito en *Enterobacterales* se caracteriza por contener en la región *upstream*, la secuencia de inserción *IS*Aba125, y en la región *downstream*, el gen *ble*<sub>MBL</sub> (Figura-7).



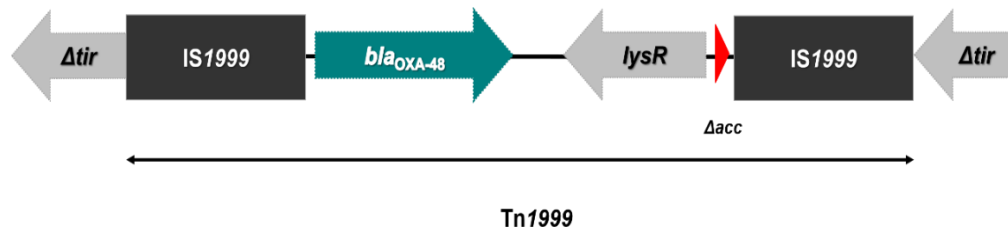
**Figura-7.** Entorno genético del gen *bla*<sub>NDM</sub>.

Tanto el gen *bla*<sub>NDM</sub> como el gen *ble*<sub>MBL</sub> se coexpresan bajo el control del mismo promotor que se localiza en el extremo 3' de *IS*Aba125. La *IS*Aba125 fue identificada previamente en un aislamiento de *A. baumannii* que, en posición *downstream* al gen *bla*<sub>NDM</sub>, contenía una segunda copia de la *IS*Aba125 que formaba parte del transposón compuesto Tn 125. El origen del gen *bla*<sub>NDM</sub> es desconocido, aunque se cree que estaba inicialmente integrado en el cromosoma de una especie ambiental de *A. baumannii* y que fue transpuesto a un plásmido de alguna especie del orden *Enterobacterales* dando lugar a la diseminación entre diferentes especies de bacterias (27,77).

### Tn1999

El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> se transporta integrado en el transposón Tn1999 y va flanqueado por dos copias de una secuencia de inserción denominada *IS*1999. Una de las copias se inserta a 26 pares de bases de distancia en dirección *upstream* del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> y la otra copia se inserta

en dirección *downstream* de la estructura *bla<sub>OXA-48</sub>-lysR-Δacc*, siendo *lysR* un regulador de la transcripción y *acc* (gen que codifica a la enzima acetil-CoA carboxilasa) (Figura-8) (60).



**Figura-8.** Entorno genético del gen *bla<sub>OXA-48</sub>*.

El análisis de las secuencias que flanquean el gen *bla<sub>OXA-48</sub>* sugiere que se originó en un aislamiento de la especie *Shewanella spp.* y que la secuencia de inserción *IS1999* fue la que favoreció la movilización del gen *bla<sub>OXA-48</sub>* a los plásmidos facilitando así, la diseminación entre las diferentes especies bacterianas (5,55,60,62,77,78). Existen otras variantes del *Tn1999*, por un lado, está el *Tn1999.2* que contiene en dirección *upstream* una *IS1R* en la *IS1999* que da lugar a un promotor híbrido con una actividad enzimática dos veces mayor que la variante *Tn1999*. Por otro lado, la variante *Tn1999.3* que contiene una segunda copia de *IS1R* localizada en posición *downtream* al gen *bla<sub>OXA-48</sub>* (60).

### 4.4.3 Integrones.

Los integrones (In) son estructuras genéticas que se caracterizan por captar genes de resistencia a antibióticos y por diseminarse ampliamente entre bacterias Gram-negativas, en concreto entre miembros del orden *Enterobacterales* (84). Se descubrieron por primera vez en la década de los 80 en aislamientos clínicos y desde entonces se han estudiado con más profundidad en los entornos hospitalarios por su asociación con otros EGMs del tipo

transposones o plásmidos que dan lugar a fenotipos de multirresistencia en los aislamientos clínicos (85).

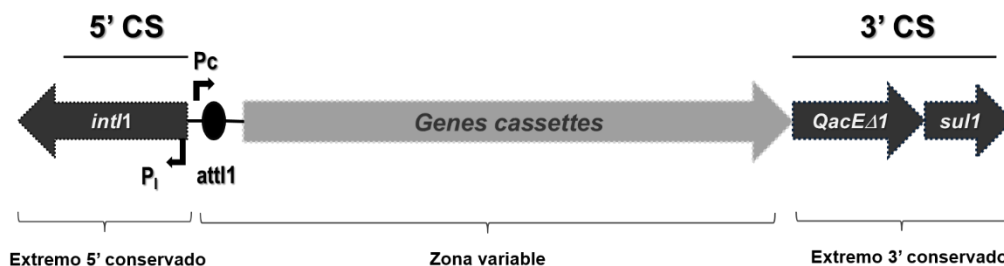
Los integrones se clasifican en función de su estructura en sencillos o complejos. La estructura más sencilla consta de tres elementos que son necesarios para llevar a cabo la captura y la expresión de genes exógenos que se van a denominar *cassettes* génicos. El primer elemento que forma parte de un integrón es el gen de la integrasa (*intI*), el segundo es el sitio de recombinación (*attI*) y el tercero es un promotor ( $P_C$ ) que se encarga de promover la expresión de los genes *cassettes* que se han integrado. A veces, puede contener un segundo promotor ( $P_2$ ) localizado adyacente en dirección 3' del primer promotor (84). Se ha demostrado que la expresión de los genes *cassettes* se reduce cuanto mayor es la distancia que separa a  $P_C$  y  $P_2$  (57).

El sitio de recombinación específico o *attI* está formado por 65 pb e incluye dos regiones donde se une la integrasa y un sitio de recombinación, en el cual los genes *cassettes* son integrados por la acción de la integrasa (*IntI*). El gen de la integrasa tiene un tamaño aproximadamente 1kb, por lo que un integron sencillo que no tiene genes *cassettes* incorporados se estima que tendría un tamaño de 1,1Kb. Por lo tanto, el tamaño de un integrón va a depender del número de genes *cassettes* que se integren (84). El proceso de integración de genes es reversible, por lo que no es raro detectar la eliminación o pérdida de genes *cassettes* de un integrón (86–88).

Los genes *cassettes* se encuentran formando parte de integrones como secuencias lineales, aunque de forma excepcional también se pueden encontrar fuera de integrones en forma circular no replicativa o en asociación con plásmidos o con el cromosoma bacteriano (57). Tienen un tamaño que oscila entre 0,5 – 1 Kb y son movilizados por la integrasa, que es capaz de reconocer el sitio *attC* localizado en posición 3' del gen *cassette* y el sitio *attI* del integrón, permitiendo tanto su integración como su escisión. Además, los genes *cassettes* no

contienen un promotor y son transcritos utilizando el promotor del integrón ( $P_I$ ) en un ARN mensajero (ARNm) policistrónico (84).

Existe una clasificación de integrones que está basada en la secuencia del gen de la integrasa. Hasta el momento se conocen 9 clases de integrones, de los cuales, las clases 1, 2 y 3 son las que contienen genes *cassettes* de resistencia a los antibióticos. Los integrones más frecuentemente detectados en aislamientos clínicos son los de clase 1 y su estructura se caracteriza por tener en el extremo 5' una secuencia conservada (5'-CS) que contiene el gen de la integrasa y un extremo 3' con una estructura denominada 3'-CS, que contiene un gen que confiere resistencia a los componentes de amonio cuaternario (*qacE $\Delta$ 1*) y un gen de resistencia a sulfonamidas (*sul1*) (Figura-9) (84). La inserción de los genes *cassettes* siempre se realiza en el mismo punto, de esta manera, se puede conocer el orden de inserción de los genes, siendo el más cercano a 5'-CS el último que se incorporó a la matriz de genes (82).

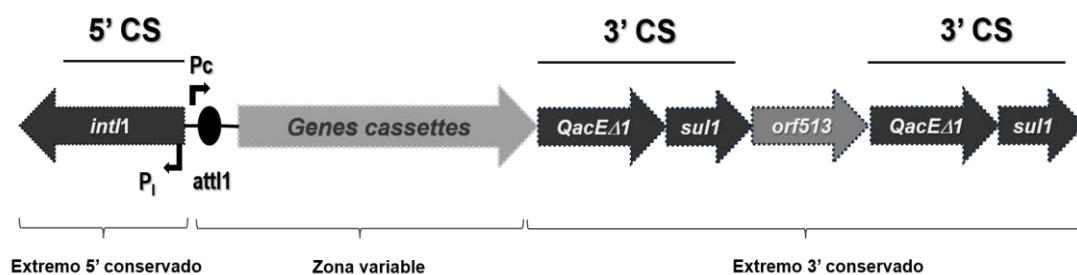


**Figura-9.** Estructura de un Integrón sencillo de Clase 1.

### A. Integrones de clase 1.

La mayoría de los integrones de clase 1 que han sido detectados en aislamientos clínicos se han visto asociados a un módulo de transposición, siendo el más frecuente el Tn402, actualmente denominado Tn5090, cuya estructura ha sido descrita en el apartado anterior (Figura-10).

Existe un tipo de integrón de clase 1 que contiene una segunda copia del segmento 3'-CS que se denomina integrón compuesto. Estos integrones se caracterizan por tener un segmento común de 2,1 Kb localizado entre las dos repeticiones 3'-CS, que se le denominó región común (CR, "*common region*") y que estaba compuesto por una transposasa de 513 aminoácidos (*orf513*) (84).



**Figura-10.** Estructura de un Integrón compuesto de Clase 1.

### B. Integrones de clase 2.

El gen *IntI2* se describió por primera vez asociado al transposón Tn7 que es insertado frecuentemente en un sitio específico del cromosoma bacteriano, aunque también puede integrarse en algunos plásmidos conjugativos contribuyendo a su diseminación entre especies bacterianas. La mayoría de integrones de clase 2 que se han descrito en la actualidad contienen un codón de paro (TAA) que da lugar a la disfuncionalidad del gen *IntI2*. El Tn7 se caracteriza por tener en la secuencia terminal un gen *cassette* truncado que se conoce como *orfX* o *ybeA* que se ha utilizado para amplificar los genes *cassettes* que están contenidos en los integrones de clase 2 (89).

### C. Integrones de clase 3.

El primer integrón de clase 3 (*intl3*) se detectó en un aislamiento de *S. marcescens* que transportaba el gen *bla<sub>IMP</sub>* (83). Los integrones de clase 3 son más parecidos a los de clase 1 y también parecen estar asociados a transposones de tipo Tn402 (Tn5053) y normalmente no se encuentran en aislamientos clínicos, pero si en cepas ambientales (57,89).

Hasta la fecha, se han incluido en la base de datos INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>) 8.562 genes *cassettes*. Los más relevantes, desde el punto de vista clínico, son los que codifican para  $\beta$ -lactamasas y para las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs). Dentro de las  $\beta$ -lactamasas se incluyen las MBL, siendo VIM e IMP las más comunes, seguido de las carbapenemasas de clase A (GES). Dentro de las EMAs, la enzima bifuncional *aacA4/aac (6')-Ib-cr*, es una de las más frecuentes que se encuentran formando parte de integrones, confiere resistencia a tobramicina más gentamicina y/o amikacina, además de la resistencia de bajo nivel a fluoroquinolonas mediado por un mecanismo de acetilación que da lugar a la inactivación de las moléculas de aminoglucósidos y de quinolonas (57).

#### 4.4.4 Plásmidos.

Los plásmidos son elementos de ADN extracromosómico de doble cadena, circulares y de tamaño variable (1-100 kb) que tienen la capacidad de replicarse de forma independiente al cromosoma bacteriano y de forma autorregulada (90). Los plásmidos no son imprescindibles para la supervivencia de la célula, ya que, a diferencia del cromosoma, no codifican genes que participan en las funciones celulares. Sin embargo, si son esenciales para mantener la adaptabilidad y la persistencia de la bacteria (12).

La estructura de un plásmido está organizada de forma modular y está constituida por un conjunto de genes conservados ("*backbone*") cuya función está relacionada con el



mantenimiento de los procesos de replicación, estabilidad, establecimiento y movilización (57,91). Los genes que no se relacionan con estas funciones forman parte del módulo de genes accesorios y generalmente codifican genes relacionados con el fenotipo de la bacteria como son, los genes de virulencia o resistencia a los antibióticos, que le pueden conferir características que pueden ser clínicamente relevantes (91).

Los genes que forman parte del módulo de replicación están agrupados en una región denominada replicón. Se encargan de controlar el número de copias que está presente en la célula para asegurar la herencia tras la división celular, de tal forma que no sea ni insuficiente ni excesiva ya que podría ser una carga metabólica extra para el hospedador (92). El replicón tiene un tamaño aproximado de 3 Kb y está formado por un origen de replicación (*ori*), genes *cop/inc* implicados en el control del inicio de la replicación y los genes *rep*, que codifican a las proteínas Rep y que son necesarios para iniciar la replicación y su regulación. Los plásmidos de tamaño pequeño suelen mantenerse en número de copias elevado para asegurar su existencia. Sin embargo, los plásmidos más grandes generalmente están presentes en número de copias más reducidos para minimizar la carga sobre la célula hospedadora (57). El control de la replicación de forma autónoma da lugar al fenómeno de incompatibilidad plasmídica. Esta característica ha sido históricamente utilizada para la clasificación de los plásmidos en grupos de incompatibilidad, que se será descrita en detalle más adelante.

Existen diversas formas de clasificar a los plásmidos. Por una parte, está la clasificación basada en la capacidad de movilización y, por otro lado, en función de la estabilidad del plásmido en el momento de la conjugación (91,93).

### **A. Clasificación basada en las propiedades de movilidad.**

Se ha definido tres tipos de plásmidos en función de la capacidad de transferencia horizontal:

### Plásmidos conjugativos

Aquellos que promueven la transferencia horizontal de genes de resistencia entre diferentes bacterias por sí mismos, a través del proceso de conjugación bacteriana. Poseen la maquinaria de genes necesaria para llevar a cabo esta transferencia de genes. Entre estos genes, se incluyen:

- El relaxosoma (módulo MOB o Dtr, *DNA transfer replication*) que se encarga de reconocer y procesar el ADN que se va a transferir. Está formado por un origen de transferencia (*oriT*) y por una relaxasa (Tra/Mob).
- El sistema de secreción tipo IV (T4SS) que se encarga de generar un conducto transmembrana capaz de transportar el complejo ADN-relaxasa desde la célula donadora a la célula receptora.
- La proteína acopladora (T4CP, *Coupling Protein*) que se encarga de comunicar el relaxosoma con el T4SS.

### Plásmidos movilizables

Son aquellos que se van a transmitir sólo en presencia de funciones conjugativas de otro plásmido conjugativo que reside en la misma célula. Estos plásmidos carecen de los genes que se necesitan para la unión de las células (T4SS), pero sí que contienen los elementos que componen el relaxosoma (relaxasa y *oriT*).

### Plásmidos no movilizables

Son los que permanecen en la célula y no pueden transferirse por ningún mecanismo de los anteriormente descritos.

### **B. Clasificación basada en la incompatibilidad plasmídica.**

Existe otro esquema de clasificación de plásmidos que está basado en la estabilidad de los plásmidos durante la conjugación, fenómeno que se denominó incompatibilidad plasmídica (Inc) y que fue definido como la incapacidad de dos plásmidos que pertenecen al mismo grupo Inc para propagarse de forma estable en la misma célula (41,94–96). Dentro de la clasificación de incompatibilidad plasmídica, se observó que había algunos tipos de plásmidos que se mantenían estables únicamente en especies de bacterias que se encuentran estrechamente relacionadas y fueron denominados plásmidos de rango estrecho. Por otro lado, los plásmidos que mantenían una replicación eficiente en géneros de bacterias diferentes, se denominaron plásmidos de rango amplio. Teniendo en cuenta esta subclasificación, se han considerado plásmidos de estrecho rango a los grupos IncF, IncH e IncI, los cuales han sido encontrados en bacterias de la misma especie o relacionadas filogenéticamente. Mientras que los plásmidos de los grupos IncL/M, IncN, IncP e IncW se han detectado en especies de bacterias más alejadas (12,57).

La tipificación y la clasificación de los plásmidos han sido de gran utilidad para conocer la epidemiología de los genes de resistencia que son mediados por plásmidos. En 2005, *Alessandra Carattolli y cols.* desarrollaron una técnica de tipificación plasmídica basada en la detección molecular de los replicones de las principales familias de plásmidos contenidos en *Enterobacterales* mediante la realización de una PCR múltiple que se denominó PBRT ("PCR-based Replicon Typing"). Esta metodología, junto con la introducción de las técnicas secuenciación de genoma completo (SGC), han permitido estudiar la gran diversidad de plásmidos que existen en la actualidad, así como, inferir los fenómenos de transferencia horizontal que han tenido lugar en un determinado momento, permitiendo llevar a cabo la caracterización de los brotes causados por bacterias multirresistentes. Hasta el momento, en *Enterobacterales* hay descritos 27 grupos de incompatibilidad plasmídica asociados a genes

de resistencia antimicrobiana, entre ellos los grupos IncF, IncN, IncX, IncA/C, IncL/M, IncR, IncP, IncH, IncI, e IncW. (41,90,97,98).

### 4.4.5 Tipos de plásmidos portadores de carbapenemasas.

Los plásmidos juegan un papel muy importante en la difusión de genes de carbapenemasa, en particular las carbapenemasas de clase A (KPC), clase B (VIM, IMP, NDM) y clase D (OXA-48). Además de genes de carbapenemasas, los plásmidos suelen contener genes de resistencia a aminoglucósidos, cotrimoxazol, quinolonas y a otros antimicrobianos (41,99).

#### A. Plásmidos portadores de KPC.

El gen *bla*<sub>KPC</sub> ha sido identificado en plásmidos de los grupos IncF, IncX, IncL/M, IncN y también se ha descrito asociado a una estructura genética denominada transposón *Rolling-Circle* que no se puede transferir por sí misma, pero que se puede movilizar junto a otros plásmidos conjugativos que están residiendo en la misma célula. Uno de los plásmidos más estudiados por ser portador del gen *bla*<sub>KPC-3</sub> es el denominado pKpQIL, que pertenece al grupo IncFI<sub>k</sub> y que fue identificado en el clon de alto riesgo de *K. pneumoniae* ST258 (46). Además de los plásmidos del grupo IncF, el gen *bla*<sub>KPC</sub> ha sido identificado en plásmidos del grupo IncX en varios aislamientos clínicos en diferentes miembros del orden *Enterobacterales* en China y en Canadá, lo que sugiere que este plásmido ha tenido un importante papel en la diseminación a nivel global y que está participando en la transmisión horizontal entre diferentes especies de *Enterobacterales* (4).

#### B. Plásmidos portadores de MBLs.

El gen *bla*<sub>NDM-1</sub> ha sido detectado en plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad, entre los que destacan IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1 e IncN, y en diferentes especies de

*Enterobacterales* que están estrechamente relacionados. Los plásmidos del grupo IncA/C fueron los que se asociaron con mayor frecuencia con el gen *bla*<sub>NDM</sub> (41). El grupo IncA/C se caracteriza por ser plásmidos de amplio rango, lo que implica tener gran tamaño y bajo número de copias. Son capaces de replicarse en especies de *Enterobacterales*, así como, en otras especies del género *Pseudomonas* spp. Los plásmidos de este grupo son capaces de vehiculizar múltiples determinantes de resistencia como EMAs, gen de resistencia cloranfenicol, trimetoprim y sulfonamidas. Además, se han asociado con la diseminación de otros  $\beta$ -lactamasas como son las cefalosporinasas de tipo *bla*<sub>CMY</sub> y otras carbapenemasas de clase A (*bla*<sub>KPC</sub>) y MBL (*bla*<sub>VIM</sub>) (12).

### C. Plásmidos portadores de OXA-48.

El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> se caracteriza por diseminarse mayoritariamente a través de un único plásmido conjugativo de aproximadamente 60 Kb de tamaño, perteneciente al grupo IncL/M. Fue denominado pOXA-48a y no suele contener otro gen de resistencia a antibióticos (100). Los plásmidos del grupo IncL/M, fueron considerados una amenaza emergente debido a su creciente prevalencia en aislamientos clínicos y ambientales. Se han clasificado como plásmidos de amplio rango con un tamaño medio de 50-80kb y un bajo número de copias. Además, estos plásmidos también se han asociado con otro tipo de  $\beta$ -lactamasas como, BLEEs, AmpC y MBLs (12,77,78,100). Los plásmidos IncL/M que contienen gen *bla*<sub>OXA-48</sub> tienen una tasa de transferencia 40 veces mayor que los que contienen *bla*<sub>NDM</sub> debido a que *bla*<sub>OXA-48</sub> va flanqueado por Tn1999 y se inserta en el interior del gen *tir*, proteína que inhibe la conjugación bacteriana, haciendo que éste pierda su función (4,77,78,100).

## 5. Epidemiología de EPC.

En los últimos años, la prevalencia de EPC ha experimentado un aumento importante en todo el mundo convirtiéndose en una grave amenaza para la seguridad de los pacientes y para la salud pública a nivel mundial. Como ya se ha descrito en apartados anteriores, la

diseminación de carbapenemasas está mediada principalmente por EGMs de transferencia horizontal, los cuales juegan un papel muy importante en la propagación de carbapenemasas entre distintas especies de bacterias. La prevalencia de EPC y el tipo de carbapenemasa están altamente asociados a su distribución geográfica.

### 5.1 Situación epidemiológica a nivel mundial de EPC.

#### 5.1.1 Epidemiología de KPC.

Las carbapenemasas de tipo KPC son las que mayoritariamente se han diseminado a nivel mundial. Desde la descripción del primer caso de KPC en 2001 en EE. UU., estas enzimas se han convertido en las más comunes y prevalentes en las regiones de EE.UU., Latinoamérica, China, Italia, Grecia e Israel (38,101,102). Las variantes KPC-2 y KPC-3 son las más frecuentes. Actualmente, la especie de EPC portadora de KPC más común es *K. pneumoniae*, que ha dado lugar a una diseminación por todo el mundo causando un problema endémico en estas regiones (102). La diseminación de KPC se ha asociado fundamentalmente a la expansión de los clones de alto riesgo de *K. pneumoniae*, entre ellos, ST258 (EE. UU), ST11 (China, España), ST340 (Brasil y Grecia) y ST512 (Colombia, Italia e Israel) (100,103,104).

La mayoría de los genomas de *K. pneumoniae* con *bla*<sub>KPC</sub> que han sido secuenciados hasta el momento pertenecen al complejo clonal ST258. El análisis filogenético identificó que ST258 está constituido por dos clados, que se originaron por la divergencia en el gen *cps*, que codifica la síntesis de polisacáridos capsulares (10,105). El clado I (*cps*-1) se ha asociado de forma frecuente con la variante KPC-2, mientras que, el clado II (*cps*-2) con la variante KPC-3. Este hecho sugiere que las variantes de la enzima KPC surgieron, fundamentalmente, por mutaciones puntuales que ocurrieron después de la recombinación de *cps* (10,106).

### 5.1.2 Epidemiología de OXA-48.

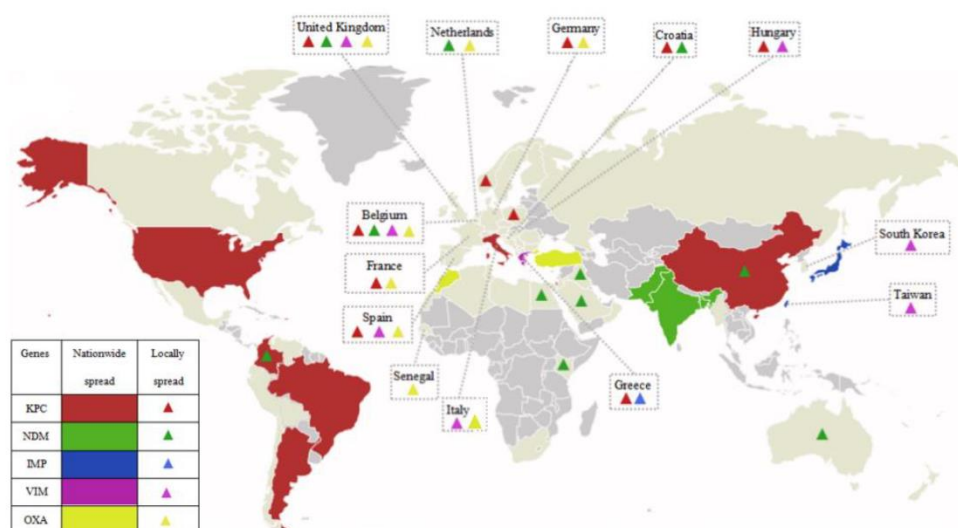
La diseminación del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> se ha concentrado fundamentalmente en los países del sur de Europa (Francia, Alemania, Países Bajos, Italia, Reino Unido y España), países de Oriente Medio (Turquía) y del norte de África (Marruecos). En la actualidad, la enzima OXA-48 es endémica de Turquía, aunque se encuentra ampliamente diseminada por toda Europa. Se ha detectado en gran variedad de especies del orden *Enterobacterales*, aunque la rápida propagación ha sido relacionada por la adquisición de clones de alto riesgo de *K. pneumoniae* y de *E. coli* (102).

### 5.1.3 Epidemiología de MBLs.

A diferencia de lo ocurrido en el continente americano y europeo, las MBLs se han diseminado de forma predominante por el sudeste asiático. Las enzimas de tipo IMP se informaron por primera vez en Okazaki (52). Desde ese momento, se han diseminado por todo Japón, Taiwán y China (5,102). El gen *bla*<sub>NDM</sub> fue descrito por primera vez en 2008 en un aislamiento de *K. pneumoniae* en la India (58). Desde entonces, las variantes de NDM se han detectado en la mayoría de miembros del orden *Enterobacterales* y se han diseminado principalmente por el continente asiático (India, Pakistán, Bangladesh y China), de tal forma que, se han convertido en el segundo tipo de carbapenemasa más común de China (107,108). La diseminación de NDM se ha visto relacionada con la transmisión de plásmidos epidémicos donde la especie más frecuente es *E. coli* y donde los clones más prevalentes son el ST131, el ST167 y el ST410 (108).

Las enzimas de la familia VIM se encuentran ampliamente representadas entre los miembros del orden *Enterobacterales*, siendo la variante VIM-1 la más frecuente. Se han descrito brotes importantes en diferentes países europeos como, Bélgica, España, Grecia, Hungría, Italia y Reino Unido, y otras regiones asiáticas como, Taiwán, China y Corea del

Sur. Sin embargo, a pesar de haberse informado EPC de tipo VIM por todo el mundo, Grecia se considera el epicentro de EPC de tipo VIM (46). En 2017, se publicó el primer trabajo donde se estudió la distribución global de VIM-1 a partir de la SGC de cepas de *Enterobacterales* obtenidas de dos programas de vigilancia (AstraZeneca y SMART). Este estudio identificó 21 tipos de integrones diferentes que albergaban el gen *bla*<sub>VIM</sub>, donde las especies más comunes que lo portaban fueron *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *Citrobacter spp.* y *E. coli*. Los resultados mostraron que la mayoría de los aislamientos productores de VIM fueron obtenidos de países europeos. Además, se detectó que el mismo integrón estaba presente en diferentes especies dentro del mismo país (In87, In624, In916 y In1323) y que ciertos integrones estaban asociados a determinados clones de alto riesgo (*E. cloacae* complex CC78 en España) (56).



**Figura-11.** Distribución global de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (Adaptación de Cui y cols., 2019, (102)).

En la Figura-11 se representa la distribución de los diferentes tipos de carbapenemasas por todo el mundo. En resumen, las carbapenemasas tipo KPC son las más



prevalentes en EE. UU., Latinoamérica, China, Italia y Grecia. Dentro de las carbapenemasas de clase MBL, las de tipo NDM han dado lugar a una diseminación por el mundo, siendo más frecuentes en China, Pakistán, India y Bangladesh; las variantes de IMP predominan en Japón, Taiwán y China; y las de tipo VIM son principalmente frecuentes en Grecia. Finalmente, las carbapenemasas tipo OXA-48 se encuentran comúnmente en Turquía, Marruecos y diseminadas por diferentes países europeos, entre ellos, Francia, Alemania, Países Bajos, Italia, Reino Unido y España.

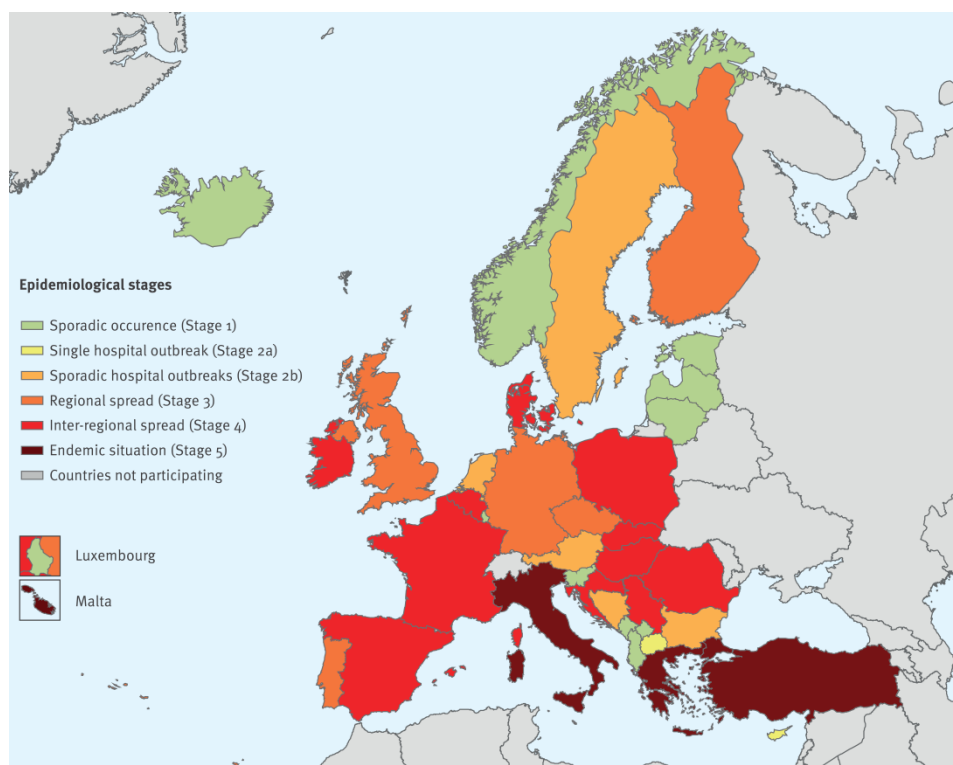
### **5.2 Situación epidemiológica de EPC en Europa.**

La situación epidemiológica en relación con la detección de EPC en Europa ha ido empeorando en los últimos años. Esta situación se puede ver representada en la Figura-12, donde se muestran los cambios epidemiológicos en relación con las EPC que han ido sucediendo desde 2010 hasta 2018 en Europa. Estos datos han sido obtenidos de una encuesta epidemiológica, denominada EurGen-Net (*European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network*) que desarrolló el ECDC en el año 2017 (109).

Country	Epidemiological stage for the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae				Change in epidemiological stage 2015–18
	2010 [11]	2013 [9]	2014–15 [8]	2018	
Albania	NA	2a	1	1	→
Austria	0	2b	2b	2b	→
Belgium	2b	3	4	4	→
Bosnia and Herzegovina <sup>a</sup>	1	1	0	2b	↑
Bulgaria	0	2a	2a	2b	→
Croatia	1	3	3	4	↑
Cyprus	2a	2a	1	2a	↑
Czech Republic	1	2b	2b	3	↑
Denmark	1	2a	4	4	→
Estonia	0	2a	1	1	→
Finland	1	2a	2a	3	↑
France	3	3	4	4	→
Germany	3	3	3	3	→
Greece	5	5	5	5	→
Hungary	3	4	4	4	→
Iceland	0	0	0	1	↑
Ireland	1	4	3	4	↑
Italy	4	5	5	5	→
Kosovo <sup>b</sup>	NA	2b	0	1	↑
Latvia	1	1	1	1	→
Lithuania	1	1	1	1	→
Luxembourg	NA	1	1	1	→
Malta	1	5	5	5	→
Montenegro	NA	0	1	1	→
The Netherlands	2a	2b	2a	2b	→
North Macedonia	NA	0	1	2a	↑
Norway	2a	2a	1	1	→
Poland	4	3	4	4	→
Portugal	1	1	2b	3	↑
Romania	1	1	4	4	→
Serbia	1	1	2b	4	↑
Slovak Republic	NA	2a	4	4	→
Slovenia	0	1	2a	1	↓
Spain	2b	3	4	4	→
Sweden	2a	2b	2a	2b	→
Turkey	NA	2a	5	5	→
United Kingdom <sup>c</sup>	2b	3	3	3	→

**Figura-12.** Comparación de la situación epidemiológica de EPC en los países europeos entre los años 2010-2018 (Adaptación de *Brolund y cols.*, 2019, (109)).

En 2018, 37 países participaron en la encuesta epidemiológica y todos ellos documentaron algún caso de EPC. Comparado con la situación de 2015, hubo 3 países (Bosnia-Herzegovina, Islandia y Kosovo) que no tuvieron casos de EPC. En general, se observó que 11 países habían empeorado su situación epidemiológica, 25 países se habían mantenido igual y un país (Eslovenia) había mejorado su situación respecto el año 2015 (Figura-12). Grecia, Italia, Malta y Turquía presentaron una situación endémica en 2018, igual que en 2015, situándose en el estado 5, siendo la peor situación descrita dentro de la escala epidemiológica establecida para evaluar la diseminación de EPC (Figura-13).



**Figura-13.** Situación epidemiológica en Europa (Julio 2018, 37 países) (Adaptación de *Brolund y cols.*, 2019, (109)).

### 5.3 Situación epidemiológica de EPC en España.

España, actualmente, se encuentra en el nivel 4 de la escala epidemiológica europea, lo que significa que la mayoría de los brotes detectados en nuestro país se han asociado a una transmisión interregional (109). La primera carbapenemasa que se describió en España se asoció a algunos casos esporádicos de MBL tipo VIM-1 detectados en *E. coli* y *K. pneumoniae* en 2003 en Barcelona (110). A partir de 2007, se fueron detectando brotes aislados de *Enterobacterales* productores de MBL, principalmente de los tipos VIM e IMP a lo largo de toda la geografía española (22,55,111–113). Fue en 2010 cuando la situación a nivel nacional cambió drásticamente dando lugar a un aumento global en la incidencia de

EPC, a expensas principalmente de *K. pneumoniae*, seguida de *E. cloacae* (71,114,115). En 2012, se produjo la emergencia, por primera vez, de *K. pneumoniae* productora de KPC que causaron brotes importantes en algunos hospitales del sur del país (116). Sin embargo, la prevalencia a nivel global en España es baja.

En 2009, se detectó por primera vez la carbapenemasa OXA-48 y, a partir de este momento, se describieron varios brotes y algunos casos aislados de *Enterobacterales* productoras de OXA-48, con predominio de *K. pneumoniae* que ha supuesto una diseminación explosiva a lo largo de todo el país (71). En 2013, se publicó un estudio multicéntrico en el que participaron 11 hospitales, donde se documentaron algunos casos de infecciones causadas por EPC, donde la especie predominante fue *K. pneumoniae* y el tipo de carbapenemasa que más frecuentemente se detectó fue en el tipo OXA-48 (117). Esta situación epidemiológica hizo imprescindible la implantación de un plan específico regional que consiguiera una detección rápida de pacientes infectados/colonizados por EPC y así poder implementar las medidas de contención adecuadas ([Plan de Prevención y control frente a la infección por EPC en la Comunidad de Madrid](#)). En 2015 se publicó un estudio en el que se analizó la estructura poblacional de 105 aislamientos de *K. pneumoniae* y reveló que la carbapenemasa OXA-48 estuvo concentrada en unos pocos clones, en concreto los clones ST11 y ST405 que son los que actualmente están circulando en nuestro país (66,103,116,118,119).

En general, los estudios realizados en los hospitales españoles identifican a la OXA-48 como la carbapenemasa más prevalente en España, la cual se ha asociado con *K. pneumoniae* ST11, que es un clon “exitoso” que se ha propagado por todo el país. Por otro lado, VIM-1 es la segunda carbapenemasa más frecuentemente detectada en *Enterobacterales* y se ha mantenido constante durante los últimos años (103,120).

### 5.4 Situación epidemiológica de EPC en la Comunidad de Madrid.

Hasta el año 2010, la detección de casos de EPC en la Comunidad de Madrid era muy infrecuente. Se habían detectado algunos casos esporádicos localizados en hospitales causados mayoritariamente por carbapenemasas de la clase A (KPC) y de clase B (VIM e IMP) (121,122).

Los datos de la encuesta epidemiológica realizada en la Comunidad de Madrid, en la que participaron 20 hospitales de esta región, mostraron que los aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos de muestras invasivas, se mantuvieron constantes en estos últimos años, con un porcentaje global del 16% de aislamientos resistentes a carbapenémicos en 2018, principalmente de tipo OXA-48. Este porcentaje fue muy superior al notificado en España para esos mismos años (3,8%) (<https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>) (22). Por otra parte, al analizar los resultados de esta misma encuesta para los aislamientos de *E. coli* productor de carbapenemasas en muestras invasivas en los últimos 3 años, se pudo observar la existencia de una tendencia ascendente de este microorganismo a expensas principalmente de la carbapenemasa OXA-48 (0,33% (7/2.136) en 2016; 0,46% (13/2.791) en 2017 y 2,17% (60/2.806) en 2018) ([Encuesta de resistencias antimicrobianas. Comunidad de Madrid 2018](#)). Estos resultados son consistentes con la situación epidemiológica acontecida en el país en la actualidad, donde se hace evidente la presencia de *E. coli* productor de OXA-48 como microorganismo emergente a tener en cuenta (123).

### 6. Papel de los EGMs en la diseminación de carbapenemasas entre los clones de alto riesgo de las especies de *Enterobacterales*.

Los clones de alto riesgo o “cepas exitosas” han demostrado tener una gran capacidad para colonizar varios ambientes, diseminarse entre diferentes especies bacterianas y persistir en gran variedad de nichos ecológicos. Además, estos clones han adquirido cierto grado

adaptativo que les confiere algunas habilidades de supervivencia. Actualmente, los clones de alto riesgo juegan un papel muy importante en la diseminación de la resistencia a los antibióticos por todo el mundo. Son consideradas la principal fuente de diseminación, ya que han contribuido con la propagación de ciertas estructuras genéticas portadoras de genes de resistencia y virulencia como son, los integrones, transposones y plásmidos (124).

En este sentido, los plásmidos son unos de los vehículos más importantes para transmitir los genes de resistencia a los antibióticos. El concepto de plásmido epidémico de resistencia surgió a raíz de un trabajo realizado por A. Carattoli en 2009, que los definió como a aquellos plásmidos que tienen capacidad de adquirir genes de resistencia y tienden a diseminarse entre los miembros de *Enterobacterales*. Los plásmidos epidémicos suponen una ventaja selectiva para los clones de alto riesgo (46,97).

Un ejemplo de plásmido epidémico es el pKpQIL, pertenece al grupo de estrecho rango y se considera el responsable del éxito del clon ST258. Se caracteriza por llevar integrado en su estructura el gen *bla<sub>KPC</sub>* y por estar asociado mayoritariamente al clon ST258 de *K. pneumoniae* (46). Antes de 2009, se describieron algunos casos esporádicos de *K. pneumoniae* productores de KPC en regiones del noreste de EE. UU. Sin embargo, no fue hasta ese año cuando se empezaron a describir brotes por diferentes regiones de EE.UU. en los que se identificó el clon ST258 como el clon predominante de todo el país (125). Al mismo tiempo, en Israel se produjeron varios brotes causados por un aislamiento que presentaba un perfil de campo pulsado similar al del clon ST258 y que se encontraba presente en EE. UU. A continuación, se fueron comunicando casos en diferentes países como Grecia, Noruega, Suecia, Italia, Polonia, Canadá, Brasil y Corea, lo que sugirió que este clon presentaba unas características propias de un clon de alto riesgo por su capacidad de diseminación en diferentes regiones del mundo y por acumular genes de resistencia que daban lugar a un fenotipo de MDR (46,126–131). Los últimos trabajos publicados demuestran que este clon

persiste en la actualidad y que es endémico de EE.UU., Latinoamérica, China, Italia, Grecia e Israel (38,101,102).

Otros ejemplos de plásmidos epidémicos son los encargados de la propagación del gen *bla<sub>NDM</sub>*. En este caso, la diseminación de NDM que se ha visto relacionada con gran diversidad de plásmidos de amplio rango (IncA/C, IncL/M, IncN) y en diferentes especies de *Enterobacterales*.

Finalmente, se encuentra el plásmido epidémico pOXA-48a, asociado con la diseminación de la carbapenemasa OXA-48. Este plásmido pertenece al grupo IncL/M y se caracteriza por portar un único gen de resistencia, a diferencia de lo encontrado con *bla<sub>NDM</sub>* que suele ir acompañado de más genes de resistencia. El éxito de este plásmido epidémico es su elevada tasa de conjugación que, como ya se ha comentado en apartados anteriores, tiene lugar por la inactivación del gen *tir* que codifica para una proteína que inhibe la transferencia.

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



Desde que se detectó el primer caso de *E. cloacae* complex con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos en el Hospital Universitario 12 de Octubre en 2007, se ha observado un incremento significativo en el aislamiento de diferentes especies de EPC, que afectaron a pacientes ingresados en diferentes servicios clínicos del hospital. Dada la importancia de las carbapenemasas como principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en *Enterobacterales*, los objetivos planteados fueron:

1. Realizar un estudio microbiológico y molecular de los aislamientos de EPC durante el periodo 2007-2017 en el Hospital Universitario 12 de Octubre.
2. Caracterizar los brotes causados por diferentes especies de EPC ocurridos durante el mismo periodo:
  - 2.1. Estudiar la epidemiología molecular de los aislamientos clínicos de *E. cloacae* con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos durante 2007- 2012.
  - 2.2. Estudiar la epidemiología molecular de los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos durante 2009 – 2014.
  - 2.3. Estudiar la epidemiología molecular de los aislamientos clínicos de *C. freundii* con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos durante 2009 – 2014.
  - 2.4. Estudiar la epidemiología molecular de los aislamientos clínicos de *E. cloacae* complex productores de carbapenemasa tipo NDM-7 durante 2016 – 2017.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 1. Diseño y descripción de las etapas del estudio.

El estudio se realizó en el Hospital Universitario 12 de Octubre, un hospital de tercer nivel que depende de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Es un hospital de referencia para el área sanitaria de la zona sur de Madrid y también lo es para otros distritos madrileños y otras comunidades autónomas. La infraestructura del hospital está constituida por tres edificios, la Residencia General, el Materno-Infantil y el Centro de Actividades Ambulatorias (CAA), y de tres Centros de Especialidades: C.E. Carabanchel, C.E. Orcasitas y C.E. Villaverde. El hospital está dotado de 1.368 camas y atiende a una población de 430.000 habitantes. Es hospital de referencia en trasplante de órgano sólido y pacientes oncológicos, por lo que existe una alta prevalencia de pacientes inmunodeprimidos ingresados en el hospital.

Se llevó a cabo un estudio observacional retrospectivo de los pacientes que tuvieron alguna infección/colonización por EPC durante la estancia en el hospital, correspondientes a un periodo comprendido entre 2007 y 2017. Este trabajo se subdividió en cuatro estudios independientes que surgieron en función de la especie de EPC que emergió durante el periodo de estudio establecido:

- **1º Estudio:** Se incluyeron todos los pacientes adultos con infección/colonización por *E. cloacae* con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos durante el periodo de enero de 2007 a diciembre de 2012.
- **2º Estudio:** Se incluyeron a los pacientes adultos y pediátricos con infección/colonización por *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos durante el periodo de enero de 2009 a febrero de 2014.

- **3º Estudio:** Se incluyeron a los pacientes adultos con infección/colonización por *C. freundii* con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos durante el periodo de enero de 2009 a diciembre de 2014.
- **4º Estudio:** Se incluyeron a los pacientes adultos con infección/colonización por *E. cloacae* complex con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos durante el periodo de enero de 2016 a diciembre de 2017.

## 2. Características de los pacientes.

Las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio fueron revisadas, recogiendo los principales datos demográficos, epidemiológicos, clínicos y microbiológicos, que fueron codificados y almacenados en una base de datos anonimizada. En el manejo de los datos clínicos de los pacientes se garantizó la confidencialidad de los datos según lo expuesto en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.

Las variables clínicas que se incluyeron fueron:

- Variables demográficas y epidemiológicas:
  - Edad: En todos los estudios se seleccionaron pacientes adultos (>15 años), a excepción del 2º estudio, en el que se incluyeron también pacientes pediátricos.
  - Sexo: Hombre/Mujer.
  - Estancia hospitalaria: se definió como el tiempo que permaneció el paciente en régimen de hospitalización ocupando una cama.  
Servicio de diagnóstico donde se encontraba ingresado el paciente.
- Variables clínicas:
  - Comorbilidad.
  - Antecedentes de neoplasia (sólida o hematológica).

- Patología renal: Insuficiencia renal crónica.
- Uso de dispositivos médicos (catéter, sonda uretral, otros) y procedimientos invasivos previos.
- Antecedentes de trasplante de órgano sólido o hematológico.
- Colonización vs. infección, y en este último caso tipo de infección: bacteriemia, urinaria, abdominal, otras.
- Mortalidad durante el ingreso hospitalario.
- Variables microbiológicas:
  - Tipo de muestra.
  - Identificación de la cepa bacteriana.
  - Estudio de sensibilidad a los antibióticos.
  - Confirmación de producción de carbapenemasa.
  - Tipo de carbapenemasa.

### 3. Características de los aislamientos clínicos de EPC.

Se estudiaron todas las cepas de *Enterobacterales* con sensibilidad disminuida a carbapenémicos y se seleccionaron para el estudio únicamente aquellas cepas portadoras de carbapenemasa, incluyéndose un aislamiento por paciente.

En total se incluyeron 154 aislamientos clínicos de EPC causantes de infección/colonización en pacientes ingresados en el Hospital Universitario 12 de Octubre durante enero 2007 a diciembre de 2017, siendo 43 cepas de *E. cloacae* en el 1º estudio (2007-2012), 97 cepas de *K. pneumoniae* en el 2º estudio (2009-2014), 11 cepas de *C. freundii* en el 3º estudio (2009-2014) y 3 cepas de *E. cloacae* complex en el 4º estudio (2016-2017). Ver Tablas 7-10 (Anexo de Material y Métodos).

### 4. Identificación de los aislamientos de EPC.

Durante los años 2007 a 2014, las cepas fueron identificadas mediante el sistema automatizado de microdilución con el instrumento MicroScan WalkAway (Beckman Coulter). La identificación se basó en la medida de la turbidez o de los cambios de color que se detectaron en los pocillos del panel de MicroScan tras su incubación a 37°C durante un periodo mínimo de 18 horas. A partir de 2015, las cepas fueron identificadas con los paneles de Microscan y mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) con el instrumento MALDI-Biotyper (*Brüker-Daltonics*, Alemania).

Para la identificación de las cepas bacterianas por el sistema MALDI-TOF se aplicaron las colonias de las bacterias, que crecieron previamente en placas de agar sangre, directamente en los pocillos de la tarjeta metálica y, posteriormente, se añadió 1 µl de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxicinámico). Tras la cristalización de la matriz con la muestra se procedió a la lectura de la placa en el instrumento MALDI-TOF. Los espectros obtenidos se analizaron con el *software* FlexControl 3.0 mediante la aplicación de un algoritmo que permitió comparar el espectro obtenido con los espectros almacenados en la base de datos. Los resultados obtenidos se expresaron como puntuaciones de 0 a 3 (valores  $\geq 2$  indicaron una identificación fiable a nivel de especie; valores entre 1,7-1,9 indicaron una identificación probable a nivel de género y los valores  $\leq 1,7$  indicaron una identificación poco fiable).

### 5. Estudio de sensibilidad a los antibióticos.

Para el estudio de sensibilidad a los antibióticos se utilizaron los paneles tipo combo para bacilos Gram-negativos (Neg Combo Panel Type NC53 y Neg Urine Combo Panel Type NUC59) de MicroScan®. La cantidad de bacteria que se utilizó para inocular los paneles fue de  $5 \times 10^4$  UFC/mL, previamente diluido en un caldo de *Müller-Hinton* (MH) suplementado con calcio y magnesio. La concentración de cada antibiótico se encuentra incluida en el

interior de cada pocillo deshidratado. La lectura automática de los paneles se realizó tras 18 horas de incubación a 37°C y la interpretación del antibiograma se realizó teniendo en cuenta los criterios de interpretación del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en el primer estudio (2007-2012) y, para el resto los estudios se siguieron las recomendaciones del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST versión 4.0, 2014; versión 7.0, 2017).

En este trabajo se seleccionaron todas las cepas con sensibilidad disminuida a los carbapenémicos. Según se describió en las guías de EUCAST, para la detección de mecanismos de resistencia, estas cepas son aquellas que presentan concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para los carbapenémicos por encima de los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) definidos. Sin embargo, las CMI se encontraron por debajo de los puntos de corte establecidos, por tanto, se interpretaron como sensibles (Tabla 1).

**Tabla 1.** Recomendaciones de EUCAST para el cribado de carbapenemasas en *Enterobacterales* ([EUCAST versión 1.0, 11/12/2013](#)).

Carbapenémico	CMI (mg/L)		Diámetro	
	S/I	*ECOFFs	S/I	*ECOFFs
<b>Meropenem</b>	≤2	>0,12	≥22	<25
<b>Imipenem</b>	≤2	>1	≥22	<23
<b>Ertapenem</b>	≤0,5	>0,12	≥25	<25

\*ECOFFs: *epidemiological cut-off values* (Puntos de corte epidemiológicos).

**Tabla 2.** Recomendaciones de EUCAST para el cribado de carbapenemasas en *Enterobacterales* ([EUCAST versión 2.0, 11/07/2017](#)).

Carbapenémico	CMI (mg/L)		Diámetro	
	S/I	*ECOFFs	S/I	*ECOFFs
<b>Meropenem</b>	≤2	>0,125	≥22	<28
<b>Ertapenem</b>	≤0,5	>0,125	≥25	<25

\*ECOFFs: *epidemiological cut-off values* (Puntos de corte epidemiológicos).

Los antibióticos evaluados mediante microdilución fueron: cefepime, aztreonam, ertapenem, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, ampicacina, ácido nalidíxico, fluoroquinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol, fosfomicina y tigeciclina. Además, se confirmó la CMI de los carbapenémicos (ertapenem, imipenem y meropenem) y de tigeciclina por el método E-test (AB Biodisk) siguiendo las recomendaciones de EUCAST. Se preparó un inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC/mL con una turbidez 0,5 McFarland, se extendió sobre una placa de *Müller-Hinton* (bioMérieux) y se incubó un mínimo de 18-20 horas a 37°C.

## 6. Detección de carbapenemasas.

### 6.1 Métodos fenotípicos.

El cribado fenotípico para detectar la producción de carbapenemasa se realizó a todos los aislamientos que cumplieron con los criterios de inclusión previamente descritos. La determinación fenotípica incluyó la realización del Test de *Hodge* Modificado (THM), la utilización de E-test MBL y la siembra en medios cromogénicos.

#### 6.1.1 Test de Hodge Modificado.

El THM fue recomendado por primera vez por el CLSI en el año 2009 como prueba fenotípica de confirmación. Este ensayo presenta una elevada sensibilidad, sin embargo, tiene algunas limitaciones, como que no es capaz de diferenciar el tipo de carbapenemasa, tiene resultados falsos negativos con MBL que se pueden solventar añadiendo sulfato de zinc al medio, y presenta resultados falsos positivos en cepas con hiperproducción de cefalosporinasa de tipo AmpC más la pérdida de porinas, que se puede resolver en gran parte añadiendo cloxacilina u oxacilina al medio.



Para la realización de esta prueba se preparó una suspensión 0,5 McFarland (equivalente a  $10^8$  UFC/mL) de una cepa control de *E. coli* ATCC 25922, sensible a carbapenémicos, en suero salino (NaCl 0,9%), posteriormente se realizó una dilución 1/10 y se inoculó en un medio de *Müller-Hinton*. A continuación, se colocó un disco de ertapenem (10 µg) en el centro de la placa. Finalmente, se realizaron estrías con un asa de siembra con dirección desde el centro hacia los extremos de la placa con la cepa control y con la cepa con fenotipo compatible de producir carbapenemasa. La placa se incubó durante 24h a 37°C (132,133). Se aceptaron los resultados como positivos cuando se observó una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora o cepa control y negativos cuando no se observó esta zona distorsionada. Las cepas que tuvieron resultados positivos se seleccionaron para la realización de estudios genotípicos.

### 6.1.2 E-Test MBL.

Las cepas con fenotipo compatible con la producción de carbapenemasa de tipo MBL se seleccionaron para realizar E-test MBL. Las tiras MBL (MP/MPI) estaban compuestas en un extremo de meropenem (0,125-8) y en el otro extremo meropenem con EDTA (0,032-2). Se preparó un inóculo de cada cepa hasta conseguir un 0,5 McFarland, se extendió sobre un medio *Müller-Hinton*, se colocó la tira MP/MPI y se incubó durante 18-20 horas a 37°C. Los resultados se consideraron positivos cuando el valor de la ratio de CMI de MP/MPI fue mayor o igual a 8, o bien se observó la presencia de una zona fantasma entre las dos secciones de gradiente. Se consideraron negativos cuando el valor de la ratio de CMI de MP/MPI fue menor a 8 y no se observaba zona fantasma.

### 6.1.3 Medios cromogénicos.

Para la confirmación de aquellas cepas con THM con resultados dudosamente positivos se dieron pases al medio cromogénico ChromID® CARBA SMART (bioMérieux).

Este medio es una bi-placa que contiene dos medios cromogénicos selectivos para el cribado, en un solo paso, de EPC. El medio CARBA permitió el crecimiento de EPC tipo KPC, MBL y OXA, y el medio OXA, permitió seleccionar a las EPC tipo OXA-48. Además, estos medios tienen 3 sustratos cromogénicos que permiten identificar las *Enterobacterales* más frecuentemente aisladas, *E. coli* presenta una coloración rosa burdeos y *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp* y *Citrobacter spp* (KESC) crecen como colonias con una coloración azul-verdosa.

## 6.2 Métodos genotípicos.

### 6.2.1 Detección de carbapenemasas.

#### A. Extracción de ADN genómico.

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo mediante un proceso manual a partir del kit comercial *DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de un cultivo fresco en medio líquido de *Luria Bertani- Bouillon* (LB) de las cepas a estudiar tras 18-20 horas de incubación con agitación a 37°C de donde se recogieron de 1mL ( $5 \times 10^6$  UFC/mL) y se centrifugó a 300 x g.

#### B. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La concentración del ADN extraído de las cepas seleccionadas se determinó mediante el fluorómetro Invitrogen™ Qubit™ 3. Este instrumento permite cuantificar de forma exacta la cantidad de ADN, ya que es un método que utiliza unas sondas selectivas que cuando se unen al ADN de doble cadena emiten fluorescencia y se puede medir sin interferencia de otros componentes.

### **C. Amplificaciones de los genes que codifican para carbapenemasas.**

La amplificación de los genes se realizó por PCR (*polymerase chain reaction*) en reacciones individuales para cada gen mediante el termociclador convencional LabCycler (SensQuest®). Los *primers* específicos para cada tipo de carbapenemasa y las condiciones utilizadas en cada experimento de PCR se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** *Primers* y condiciones de PCR para la caracterización de los genes que codifican para carbapenemasas.

<i>Primers</i>	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	Condiciones	Referencias
KPC-F	TCGCTAAACTCGAACAGG	761	n=1 94°C 12min; n=35 94°C 30seg, 60°C 30seg, 72°C 45seg; ext 72°C 10min	<a href="#">CID 2006; 43:e26-28</a> ; (134)
KPC-R	TTACTGCCCCGTTGACGCCCAATCC			
VIM-1-F	GTAAAAAGTTATTAGTAGTTTATTG	799	n=1 94°C 12min; n=35 94°C 30seg, 56°C 30seg, 72°C 45seg; ext 72°C 10min	<a href="#">AAC 2007; 51:4329-4335</a> ; (135)
VIM-1-R	ATGAAAGTGCGTGGAGAC			
VIM-2-F	ATG-TTC-AAA-CTT-TTG-AGT-AAG	801	n=1 94°C 12min; n=35 94°C 30seg, 56°C 30seg, 72°C 45seg; ext 72°C 10min	<a href="#">AAC 2007; 51:4329-4335</a> ; (135)
VIM-2-R	CTA-CTC-AAC-GAC-TGA-GCG			
IMP-1-F	ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741	n=1 94°C 12min; n=35 94°C 30seg, 56°C 30seg, 72°C 45seg; ext 72°C 10min	<a href="#">AAC 2007; 51:4329-4335</a> ; (135)
IMP-1-R	TTAGTTGCTTGGTTTTGATGG			
IMP-2-F	ATGAAGAAATTATTTGTTTTATG	741	n=1 94°C 12min; n=35 94°C 30seg, 56°C 30seg, 72°C 45seg; ext 72°C 10min	<a href="#">AAC 2007; 51:4329-4335</a> ; (135)
IMP-2-R	TTAGTTACTTGGCTGTGATG			
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	n=1 94°C 10min; n=36 94°C 30seg, 52°C 40seg, 72°C 50seg; ext 72°C 5min	<a href="#">JCM 2011; 49:718-721</a> ; (136)
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
OXA-48-F	GTG GGATGGACAGACGCG	744	n=1 95°C 10min; n=40 95°C 5sg, 56°C 10sg, 72°C 15sg; ext 72°C 10min	<a href="#">AAC 2012; 56:559-562</a> ; (137)
OXA-48-R	CCACACATTATCATCAAGTTC			

La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  de acuerdo con las cantidades que se detallan a continuación:

Mix-PCR	Concentración	Volumen
Buffer de reacción (10 mM TRIS-HCL pH=8, 50 mM KCl)	10X	5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 $\mu\text{L}$
dNTPs	10 mM	1 $\mu\text{L}$
Primer Forward	100 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{L}$
Primer Reverse	100 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{L}$
Taq polimerasa (AmpliTaq Gold™)	1-2U	0,5 $\mu\text{L}$
Agua grado PCR c.s.p 50 $\mu\text{L}$	-	39,5 $\mu\text{L}$
ADN de la muestra	100 ng	1 $\mu\text{L}$

### D. Visualización de los productos amplificados.

Para la visualización de los fragmentos de ADN que fueron amplificados por PCR se prepararon geles de agarosa en 0,5% de buffer TBE (Tris-Borato-EDTA a 10X). La concentración de agarosa que se utilizó dependió del tamaño molecular de los fragmentos a separar. Para fragmentos entre 0,5-20 kb se prepararon geles de agarosa de 0,7-0,8% (peso/volumen) y para fragmentos más pequeños se requirieron concentraciones más elevadas de 2% (peso/volumen). Antes de la solidificación del gel se añadieron 5  $\mu\text{L}$  del reactivo GelRed®, que es un agente intercalante de ADN que permite visualizar las moléculas de ADN con luz ultravioleta. Una vez solidificado el gel, se procedió a cargar las muestras en los pocillos del gel y la cantidad de muestra que se añadió fue de 20  $\mu\text{L}$  de muestra y 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (4%). La separación de los fragmentos se llevó a cabo mediante electroforesis en corriente continua en una cubeta de 10 cm con un voltaje de 80-90 V. El patrón de bandas

obtenido se analizó con el equipo *Kodak Gel Logic 100 Imaging System*. La longitud de la banda se estimó comparando con un marcador de peso molecular de longitudes conocidas. Los marcadores que se utilizaron para la interpretación de la longitud de las bandas fueron ØX174 RF Hae III, 1 Kb DNA *Extension* Ladder 100 µg (1 µg/µL) y 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, life Technologies).

### E. Secuenciación de ADN amplificado.

#### Purificación de ADN

Previo al paso de secuenciación, se realizó una purificación de los productos amplificados utilizando el kit comercial ExoSAP-IT™ purification kit (USB Corp., Cleveland, Ohio, EE. UU.). Este kit está compuesto por una exonucleasa tipo I (EXO) que degrada los cebadores o nucleótidos que han quedado libres en la reacción de amplificación y que pueden originar interferencias en la reacción de secuenciación, además de, una fosfatasa alcalina (SAP) que defosforila los dNTPs sobrantes. Por cada 5 µL de producto amplificado se añadieron 2 µL de reactivo ExoSAP-IT para obtener un volumen total de 7 µL, por cada tubo de reacción. A continuación, se realizó una incubación a 37°C durante 15 minutos para eliminar nucleótidos y cebadores y, finalmente, 15 minutos a 80°C para inactivar a la enzima exonucleasa I.

#### Reacción de secuenciación

Los productos amplificados y purificados fueron secuenciados por el método Sanger o método de los dideoxinucleótidos utilizando la química ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0 de Applied Biosystems. Esta estrategia está basada en la obtención de fragmentos de ADN de diferentes tamaños en presencia de la enzima ADN polimerasa, de los cuatro dideoxinucleótidos que componen la secuencia de ADN (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y de los cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) que carecen de grupo hidroxilo y que finalizan la elongación. Estos fragmentos fueron separados por electroforesis

capilar en el secuenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Monza, Italia). La reacción de secuenciación que se llevó a cabo se describe a continuación:

Mix-PCR	Concentración	Volumen
Terminator Ready reaction Mix	10X	4 µL
<i>Primer Forward</i>	4 µM	1 µL
<i>Primer Reverse</i>	4 µM	1 µL
Agua grado PCR c.s.p 10 µL	-	1 µL
ADN de la muestra	5-20 ng	3 µL

Los *primers* que se utilizaron en la reacción de secuenciación fueron los mismos que se incluyeron en la reacción de amplificación de los diferentes tipos de carbapenemasas (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>) pero a distintas concentraciones y que vienen especificados en la Tabla 3 (descrita en el apartado anterior). Las condiciones de la PCR de secuenciación fueron las siguientes:

### N= 1 ciclo

- Desnaturalización 96°C durante 10 minutos

### N= 25 ciclos

- Desnaturalización 96°C durante 30 segundos
- Hibridación 50°C durante 15 segundos
- Elongación 60°C durante 4 minutos

Tras la reacción de secuenciación se procedió a precipitar el ADN secuenciado siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

- En primer lugar, se preparó una mezcla de 62,5 µL de etanol (95%), 3 µL acetato sódico (3M, pH 4,6) y 14,5 µL de agua desionizada.

- Se añadieron 80 µL de la mezcla anterior a cada uno de los pocillos que contiene 20 µL de la reacción de secuenciación.
- Se mezcló bien utilizando vórtex y se centrifugó a 3.000 x g durante 20 minutos.
- A continuación, se decantó el sobrenadante invirtiendo la placa y se volvió a centrifugar a 50 x g durante 1 minuto.
- Se añadió 150 µL de etanol (70%) en cada pocillo de reacción, se centrifugó a 3.000 x g durante 5 minutos y se volvió a decantar el sobrenadante.
- Finalmente, se añadieron 20 µL de formamida a cada pocillo de reacción y se colocó la placa en el secuenciador.

### Análisis de las secuencias

La información proporcionada por el secuenciador automático fue almacenada en ficheros binarios con extensión **.abi** y **.fasta** que incluyeron las secuencias de nucleótidos y las calidades, así como un cromatograma o registro gráfico bidimensional que se obtiene tras la separación de los fragmentos por cromatografía. Para el análisis preliminar de la calidad de las secuencias se utilizó el *software* Chromas donde se procedió a editar las posiciones ambiguas o dudosas y a recortar los extremos de las mismas. Las secuencias se ensamblaron con el *software* Geneious 5.4.4 (Biomatters, Ltd) y posteriormente, se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 7. Tipificación Molecular.

La tipificación molecular de los aislamientos clínicos se llevó a cabo mediante electroforesis en campo pulsado o *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) para todas las



EPC incluidas en el estudio y mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST), únicamente en aquellas especies donde este método estaba descrito, ver Tablas 7-10.

### 7.1 PFGE.

Es una técnica molecular que estudia la relación existente entre varios aislamientos de una especie bacteriana concreta de interés epidemiológico. Este método se basa en la digestión de ADN cromosómico con una enzima de restricción con baja frecuencia de corte que genera un número variable de fragmentos de diferentes tamaños (10 – 30), que oscilan entre 10 y 1.000 kb, y que son separados por una electroforesis en campo pulsado en una cubeta CHEF DR® III System (BioRad). Los perfiles de ADN o pulsotipos fueron interpretados a través del *software* Bionumerics 3.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) siguiendo los criterios de *Tenover y cols* (138). Este programa trabaja con un algoritmo que permite realizar estudios de filogenia para obtener la relación evolutiva entre los aislamientos a través de dendrogramas. El proceso de PFGE se divide en tres fases:

- Extracción de ADN e inmovilización en bloques de agarosa para minimizar su fragmentación.
- Digestión del ADN con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte. En el caso de *Enterobacterales* se utilizó el enzima de restricción *XbaI*.
- Electroforesis con aplicación de campo eléctrico variable lo que permite separar fragmentos de ADN de gran tamaño. Para ello, se utilizan unas cubetas especiales acrílicas de forma hexagonal y formada por 24 electrodos.

En este trabajo se realizó PFGE para estudiar la relación existente entre los aislamientos clínicos de *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *C. freundii*. Para ello, se diseñó un protocolo general para *Enterobacterales* que se describe a continuación:

### 1º Día: Preparación de las muestras (I)

- Descongelar las muestras que estaban archivadas en el cepario del laboratorio de Microbiología del H12O.
- Sembrar cada aislamiento clínico en placas de agar sangre (bioMérieux).
- Incubar a 37° C durante 24 horas.

### 2º Día: Preparación de las muestras (II)

- Inocular 3-4 colonias de igual morfología en 5 mL de LB, incubarlas a 37°C durante toda la noche en agitación. Para la preparación de 1L de LB se necesitó disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y c.s.p 1L de H<sub>2</sub>O.

### 3º Día:

#### Determinar el inóculo bacteriano

- Vortear los tubos de LB con la suspensión bacteriana.
- Pipetear 1,5 mL de la suspensión bacteriana a partir del LB en un tubo *ependorf* de 1,5 ml.
- Centrifugar el tubo *ependorf* a 8.000 r.p.m durante 2 min.
- Aspirar el sobrenadante y añadir 500 µL de PIV (Tris HCl 1M, pH=8, NaCl 5M) para resuspender el *pellet*.
- Centrifugar de nuevo a 8.000 r.p.m 2 min. Retirar sobrenadante.
- Añadir 300 µL de PIV y resuspender el *pellet* completamente.
- Para ajustar la suspensión bacteriana, se midió la densidad óptica (D.O) a 620 nm que requería estar entre 0,8 y 1,2 según la fórmula  $V_{dil (PIV)} = D.O_{620} \times 40 \times 210 - 210$ .

#### Preparar los moldes de agarosa

- Mezclar 200 µL de la suspensión bacteriana previamente ajustada con 200 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% fundida previamente.
- Rellenar los moldes y dejar solidificar los bloques de agarosa al menos 1 h a 4°C.

### Lisis

- Preparar la solución de lisis, para 100 mL mezclar:
  - 6mM Tris-HCl (pH=8) → 0,6 mL
  - 5M NaCl → 20 mL
  - 0,5M EDTA (pH=8) → 20 mL
  - 10% Desoxicolato sódico → 2 mL
  - 10% Sarcosyl → 5 mL
- Dispensar 1 mL de la solución de lisis en tubos estériles.
- Empujar cuidadosamente los bloques de agarosa solidificados en los tubos que contienen un 1 ml de la solución de lisis e incubar a 37°C durante 5 horas.

### Tratamiento con *Proteinasa K*

- Preparar la solución ES, para 100 mL mezclar:
  - 0,5M EDTA (pH=8) → 90 mL
  - 10% Sarcosyl → 10 mL
- Decantar la solución de lisis y sustituirla por 1 mL de solución ES de *Proteinasa K* (1 mg/mL).
- Incubar a 50° C toda la noche en el horno de hibridación.

### 4º Día:

#### Lavados

- Aspirar la solución de *Proteinasa K*.
- Realizar los lavados de los bloques de agarosa con 6 mL de una solución TE 1X (Tris HCl 10mM, pH=8, EDTA 0,1mM, pH=8) en agitación suave a temperatura ambiente.
- Repetir los lavados 4 veces durante 30 minutos.

### Digestión

- Preparar la solución de restricción con el enzima *XbaI*. Se utilizarán 40 µL por bloque de agarosa de la siguiente mezcla:
  - *XbaI* (40 Unidades/reacción) → 5 µL
  - *Buffer* (4) 10X → 30 µL
  - Albúmina bovina sérica o BSA (200 µg/mL) → 3 µL
  - H<sub>2</sub>O → 2 µL
- Incubar a 37°C durante toda la noche.

### 5º Día:

#### Preparación del gel de agarosa al 1%

- Preparar un gel de agarosa 1% en una solución de tampón TBE 0,5X. Para 1 L de TBE 0,5X, mezclar:
  - Tris base 890M → 108 g
  - Ácido bórico 890M → 55 g
  - EDTA 0,5M (pH=8) → 40 mL
- Para preparar el gel 1%, mezclar:
  - Agarosa → 1,5 g
  - TBE 10X → 7,5 mL
  - H<sub>2</sub>O → 142,5 mL
- Agitar mecánicamente la solución y dejar hidratar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Colocar el molde de PFGE en la bandeja de la cubeta CHEF-DRIII y verter la agarosa (reservar un poco de agarosa para sellar el gel al final). Dejar solidificar el gel durante al menos 1 hora.

### Colocar el gel en la cubeta CHEF-DRIII

- Hacer una pre-electroforesis al gel previamente preparado, manteniendo las mismas condiciones de electroforesis que se tendrán en la electroforesis final:

Tiempo Inicial	Tiempo Final	Tiempo total	T <sup>a</sup>	Voltaje
2,1 seg	54,1 seg	1 h	14°C	200 v

- Cargar el gel con los bloques de agarosa cada uno en un pocillo y dejar los pocillos de los extremos para cargar el marcador de peso molecular (Lambda).
- Una vez cargado, sellar los pocillos con la agarosa reservada previamente.
- Preparar 2 L de la solución tampón TBE 0,5X para la electroforesis. Para ello, mezclar 100 mL TBE 10X en 1.900 mL de H<sub>2</sub>O y verter la solución en la cubeta.
- Desmontar el molde que contiene el gel, colocar el gel en la cubeta CHEF-DRIII sujeto a la bandeja, programar el sistema y conectar los electrodos y encender el sistema.

Tiempo Inicial	Tiempo Final	Tiempo total	T <sup>a</sup>	Voltaje
2,1 seg	54,1 seg	23 h	14°C	200 v

### 6º Día:

#### Extracción del gel y tinción con GelRed®

- Teñir el gel con el reactivo intercalante GelRed®. Para ello, mezclar 300 mL de H<sub>2</sub>O y 20 µL de GelRed® y dejarlo 1 hora a temperatura ambiente.
- Desechar la solución de GelRed® y lavar el gel con agua durante 10 minutos.
- Visualizar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y hacer una fotografía.

### Interpretación

- La interpretación se realizó sobre la foto tomada del gel donde se comparó el patrón de bandas obtenido para cada aislamiento. Para ello, se utilizó el *software* Bionumerics que tiene algoritmos de comparación basados en los criterios de *Tenover y cols* (138).

### 7.2 MLST.

Es un método eficaz y ampliamente utilizado para las identificaciones de clones en poblaciones bacterianas basado en el estudio de 7 genes (*“loci”*) conservados (*“housekeeping”*) que pertenecen al núcleo (*“core”*) de la bacteria y que codifican genes de distintos enzimas metabólicos bacterianos. Según se van encontrando nuevas secuencias para cada *locus* se le va asignando un número que corresponde al orden de descubrimiento, de tal manera que los números de todos los *loci* se almacenan en un esquema particular denominado perfil alélico al que se le asigna un tipo de secuencia (en inglés *“Sequence Type”* (ST)). El estudio del polimorfismo en estos genes permite trazar líneas genéticas que servirán para establecer el grupo clonal al que pertenece la especie bacteriana y se ha utilizado para la caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones o fallos terapéuticos.

La base datos pública de MLST contiene las secuencias de los alelos de referencia y los STs para cada microorganismo. Esta base de datos está asociada al servidor web de la *Universidad de Oxford* (<http://pubmlst.org/>). Actualmente, esta base de datos incluye 755.852 aislamientos, 520.587 genomas y 21.941.910 alelos (actualizado 15-06-2020).

En este trabajo se determinó la relación clonal por MLST para los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*. Para el resto de las especies de EPC, no se pudo realizar MLST porque no había esquema disponible en el momento del estudio. Se seleccionaron 11 aislamientos

que fueron representativos de cada pulsotipo o clon y que se obtuvieron previamente por tipificación con PFGE (ver Tabla 8). Para ello se utilizó el esquema descrito para *K. pneumoniae* (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) (139,140).

Para la realización de MLST se siguió el protocolo habitual que consta de las siguientes etapas:

- Extracción de ADN genómico según la metodología descrita en el apartado 6.2.1.A extracción de ácidos nucleicos.
- Reacción de amplificación de los genes conservados utilizando los *primers* y las condiciones que se describen en la Tabla 4.
- Reacción de secuenciación según se describe en el apartado de secuenciación de ADN amplificado.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó por comparación con la base de datos pública de MLST (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

**Tabla 4.** *Primers* y condiciones de PCR para la realización de MLST de *K. pneumoniae*.

Locus / Función	Primers	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
<i>rpoB</i> - Subunidad β de la ARN polimerasa	rpoB-F	GGC GAA ATG GCW GAG AAC CA	501	50
	rpoB-R	GAG TCT TCG AAG TTG TAA CC		
<i>gapA</i> - Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	gapA-F	TGA AAT ATG ACT CCA CTC ACG G	450	60
	gapA-R	CTT CAG AAG CGG CTT TGA TGG CTT		
<i>mdh</i> - Malato deshidrogenasa	mdh-F	CCC AAC TCG CTT CAG GTT CAG	477	50
	mdh-R	CCG TTT TTC CCC AGC AG		
<i>pgi</i> - Fosfoglucosa isomerasa	pgi-F	GAG AAA AAC CTG CCT GTA CTG GC	432	50
	pgi-R	CGC GCC ACG CTT TAT AGC GGT TAA T		
	pgi-F (sec)	CTG GCG CTG ATC GGC AT		
	pgi-R (sec)	TTA TAG CGG TTA ATC AGG CCG T		
<i>phoE</i> - Fosfoserina E	phoE-F	ACC TAC CGC AAC ACC GAC TTC GG	420	50
	phoE-R	TGA TCA GAA CTG GTA GGT GAT		
<i>infB</i> - Factor de inicio de la traducción 2 (eIF-2)	infB-F	CTC GCT GGA CTA TAT TCG	318	50
	infB-R	CGC TTT CAG CTC AAG AAC TTC		
	infB-F (sec)	ACT AAG GTT GCC TCC GGC GAA GC		
<i>tonB</i> - Transductor de energía periplásmico	tonB-F	CTT TAT ACC TCG GTA CAT CAG GTT	414	45
	tonB-R	ATT CGC CGG CTG RGC RGA GAG		

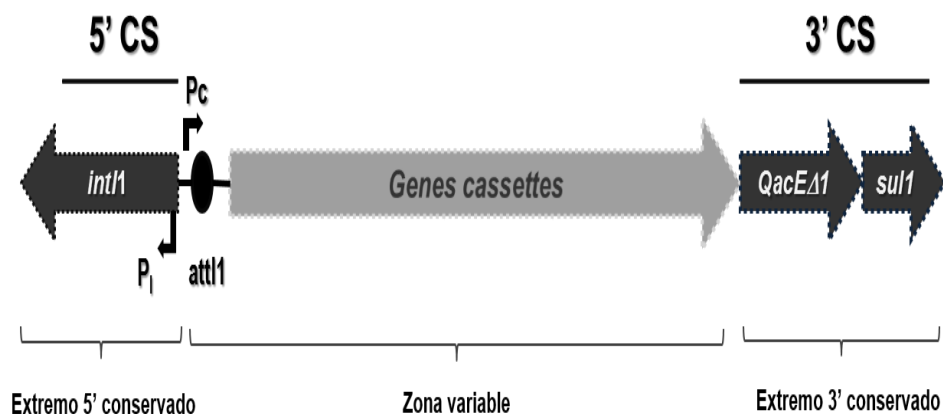
sec: secuenciación



## 8. Estudio de los elementos genéticos móviles de transferencia horizontal.

### 8.1 Caracterización del entorno genético de *bla*<sub>VIM-1</sub>.

El estudio del entorno genético de las metalo- $\beta$ -lactamasas tipo VIM-1 se llevó a cabo en las 37 cepas de *E. cloacae* que fueron aisladas en la primera fase del estudio (2007-2012). La metodología empleada para la caracterización del entorno genético de VIM-1 fue realizado mediante amplificación y la secuenciación de los genes relacionados con los integrones de clase 1. Esta estructura se compone de una región conservada en el extremo 5' (5' CS), donde se encuentra el gen de la integrasa (*intI1*), y una región conservada en el extremo 3' (3' CS), que incluye genes de resistencia a amonio cuaternario (*qacE $\Delta$ 1*) y a sulfonamidas (*sul1*). Entre las regiones 5' CS y 3' CS se encuentra la región variable del integrón formada por los *cassettes* génicos que suelen ser genes de resistencia a antibióticos o desinfectantes (Figura-14).



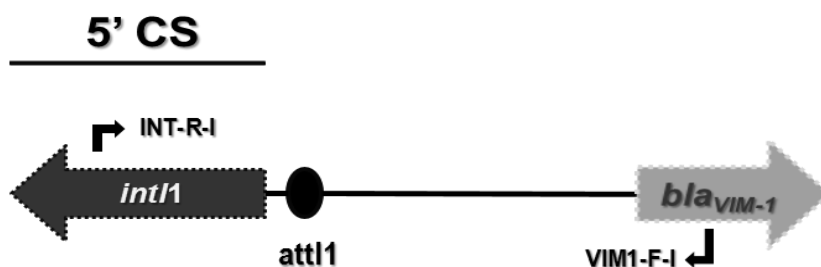
**Figura-14.** Estructura de un Integrón de Clase 1.

*attC*: lugar de recombinación de los genes *cassettes*; *intI1*: gen que codifica la integrasa de clase 1; *P<sub>I</sub>*: promotor que transcribe la integrasa; *P<sub>C</sub>*: promotor que dirige la transcripción de los genes *cassettes* integrados; *QacE $\Delta$ 1*: gen que codifica la resistencia a amonio cuaternario; *sul1*: gen de resistencia a sulfonamidas.

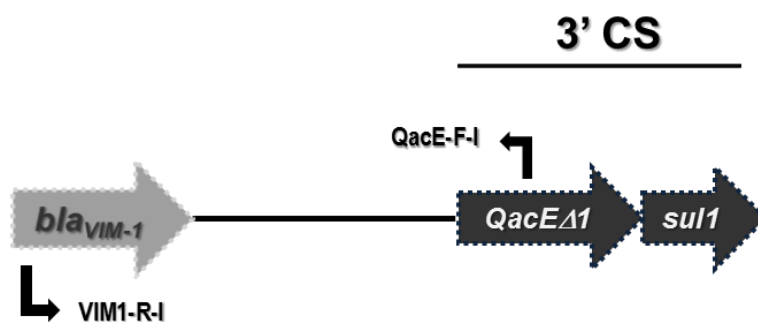
Para confirmar que la MBL tipo VIM-1 estaba incluida como *cassette* génico en el integrón de clase 1, se llevó a cabo una amplificación de los genes que forman parte de los extremos del integrón, así como, de los genes que podrían estar incluidos en la región variable mediante una PCR de genes solapantes (Figuras-15 y 16) (84,141). Posteriormente, se realizó la secuenciación de los productos amplificados, según se describe en el apartado de secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos GenBank mediante la herramienta BLAST y, además, se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos pública INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>).

El protocolo de la reacción de amplificación que se utilizó para la caracterización de los integrones de clase 1 fue el siguiente:

Mix-PCR	Concentración	Volumen
<i>Buffer</i> de reacción (10mM TRIS-HCL pH=8, 50mM KCl)	10X	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µL
dNTPs	10 mM	1 µL
<i>Primers Forward / Reverse</i>	100 µM	0,5 µL
Taq polimerasa (AmpliTaq Gold™)	1-2U	0,5 µL
Agua grado PCR c.s.p 50 µL	-	39,5 µL
ADN de la muestra	100 ng	1 µL



**Figura-15.** Estructura del integrón dirección *upstream* de *bla*<sub>VIM-1</sub>.



**Figura-16.** Estructura del integrón dirección *downstream* de *bla*<sub>VIM-1</sub>.

La secuencia de los *primers* y las condiciones de amplificación y secuenciación fueron:

<i>Primers</i>	Secuencia (5' → 3')	Condiciones	Referencias
INT-R-I	CGC AGT GGC GGT TTT CAT	n=1 94°C 12min; n=35 94°C 1min, 56°C 1min, 72°C 3min; ext 72°C 10min	<a href="#">AAC 2007: 51:4329-4335</a>
VIM1-F-I	CTT ACT CAA AAG TTT GAA CAT		
qacE-F-I	CAA GAA AAA GCC AGC CTT TC		
VIM1-R-I	CGC TCA GTC GTT GAG TAG		

### 8.2 Análisis de plásmidos.

#### 8.2.1 Extracción de ADN plasmídico.

La extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina de *Birnboim y Doli* y el método de *Barton* según se describen a continuación:

##### A. Método de lisis alcalina de *Birnboim y Doly*.

Este método se basa en la diferente resistencia a valores de pH del ADN plasmídico y cromosómico. La lisis celular y la desnaturalización del ADN plasmídico y cromosómico se consiguió aplicando una solución de dodecil sulfato sódico (SDS 1%) y NaOH (0,2N). La neutralización con acetato potásico (3M, pH=5) permitió que el ADN plasmídico volviera a su configuración original (Covalente Circular Cerrada) y que permaneció en estado soluble, mientras que el ADN cromosómico y las proteínas precipitaron en un complejo formado por el potasio. El SDS que se eliminó por centrifugación. El ADN plasmídico del sobrenadante se purificó con una solución de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (1:1:24) y una solución de cloroformo. El ADN plasmídico se recuperó por precipitación con una solución de etanol-acetato potásico (1:10) y finalmente se concentró por precipitación con etanol. En este trabajo se utilizó el kit comercial QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN), que permite obtener plásmidos que están presentes en un bajo número de copias y que tienen tamaños de alto peso molecular (hasta 150 kb) y necesita una purificación posterior con resinas de intercambio iónico. El protocolo que se realizó es el descrito por el fabricante del kit (142).

##### B. Método de *Barton*.

Este método está basado en la digestión del ADN cromosómico con la enzima S1 nucleasa y posterior separación de los fragmentos por PFGE. Esta enzima tiene la capacidad

de digerir el ADN cromosómico y de mantener en forma lineal el ADN plasmídico que se encontraba en estado superenrollado. La extracción del ADN genómico se realizó mediante el kit comercial *DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN) según instrucciones del fabricante (143).

Una vez obtenido el ADN plasmídico se llevó a cabo la cuantificación de ácidos nucleicos mediante los instrumentos Qubit™ 3 según se describe en apartados anteriores.

### 8.2.2 Determinar el grupo de incompatibilidad plasmídica.

El estudio de tipificación de plásmidos se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Alessandra Carattoli y cols. El método de tipificación plasmídica o *PCR-based replicon typing* (PBRT) se basó en detectar los principales grupos de incompatibilidad plasmídica mediante amplificación de los genes *Inc* que son los encargados de regular y controlar la replicación de los plásmidos. El protocolo consta de 5 PCR múltiples y 3 PCR simples que reconocen los principales grupos de incompatibilidad plasmídica encontrados en *Enterobacterales* (Tabla 5). Este método presenta una elevada especificidad y sensibilidad y ha resultado de gran utilidad para estudiar la evolución y diseminación de plásmidos que confieren resistencia a los antimicrobianos (98,144).

**Tabla 5.** *Primers* y condiciones de PCR para estudio de plásmidos mediante PBRT.

Tipo PCR	Primers	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	Temperatura de hibridación (°C)	
1º PCR	HI1-F	GGA GCG ATG GAT TAC TTC AGT AC	471	n=1	94°C 5min
	HI1-R	TGC CGT TTC ACC TCG TGA GTA		n=35	94°C 1min
	HI2-F	TTT CTC CTG AGT CAC CTG TTA ACA C	644		<b>60°C 30seg</b>
	HI2-F	GGC TCA CTA CCG TTG TCA TCC T			72°C 1min
	I1-F	CGA AAG CCG GAC GGC AGA A	139	n=1	72°C 5min (extensión)
	I1-R	TCG TTC CGC CAA GTT CGT			
2º PCR	X-F	AAC CTT AGA GGC TAT TTA AGT TGC TGA T	376	n=1	94°C 5min
	X-R	TGA GAG TCA ATT TTT ATC TCA TGT TTT AGC		n=35	94°C 1min
	L/M-F	GGA TGA AAA CTA TCA GCA TCT GAA G	785		<b>60°C 30seg</b>
	L/M-R	CTG CAG GGG CGA TTC TTT AGG			72°C 1min
	N-F	GTC TAA CGA GCT TAC CGA AG	559	n=1	72°C 5min (extensión)
	N-R	GTT TCA ACT CTG CCA AGT TC			
3º PCR	FIA-F	CCA TGC TGG TTC TAG AGA AGG TG	462	n=1	94°C 5min
	FIA-R	GTA TAT CCT TAC TGG CTT CCG CAG		n=35	94°C 1min
	FIB-F	GGA GTT CTG ACA CAC GAT TTT CTG	702		<b>60°C 30seg</b>
	FIB-R	CTC CCG TCG CTT CAG GGC ATT			72°C 1min
	W-F	CCT AAG AAC AAA GCC CCC G	242	n=1	72°C 5min (extensión)
	W-F	GGT GCG CGG CAT AGA ACC GT			

**Tabla 5.** *Primers* y condiciones de PCR para estudio de plásmidos mediante PBRT (Continuación).

Tipo PCR	Primers	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	Temperatura de hibridación (°C)	
4º PCR	Y-F	AAT TCA AAC ACT GTG CAG CCT G	765	n=1	94°C 5min
	Y-R	GCG AGA ATG GAC GAT TAC AAA ACT TT		n=35	94°C 1min
	P-F	CTA TGG CCC TGC AAA CGC GCC AGA AA	534		<b>60°C 30seg</b>
	P-F	TCA CGC GCC AGG GCG CAG CC			72°C 1min
	FIC-F	GTG AAC TGG CAG ATG AGG AAG G	262	n=1	72°C 5min (extensión)
	FIC-R	TTC TCC TCG CCA AAC TAG AT			
5º PCR	A/C-F	GAG AAC CAA AGA CAA AGA CCT GGA	465	n=1	94°C 5min
	A/C-R	ACG ACA AAC CTG AAT TGC CTC CTT		n=35	94°C 1min
	T-F	TTG GCC TGT TTG TGC CTA AAC CAT	750		<b>60°C 30seg</b>
	T-R	CGT TGA TTA CAC TTA GCT TTG GAC			72°C 1min
	FII <sub>S</sub> -F	CTG TCG TAA GCT GAT GGC	270	n=1	72°C 5min (extensión)
	FII <sub>S</sub> -R	CTC TGC CAC AAA CTT CAG C			
F PCR	F <sub>repB</sub> -F	TGA TCG TTT AAG GAA TTT TG	270	n=1 94°C 5min, n=35 94°C 1min, <b>52°C</b>	
	F <sub>repB</sub> -R	GAA GAT CAG TCA CAC CAT CC		30s, 72°C 1min, n=1 72°C 5min ext	
K PCR	K/B-F	GCG GTC CGG AAA GCC AGA AAA C	160	n=1 94°C 5min, n=35 94°C 1min, <b>60°C</b>	
	K-R	TCT TTC ACG AGC CCG CCA AA		30s, 72°C 1min, n=1 72°C 5min ext	
B/O	K/B-F	GCG GTC CGG AAA GCC AGA AAA C	159	n=1 94°C 5min, n=35 94°C 1min, <b>60°C</b>	
	B/O-F	TCT GCG TTC CGC CAA GTT CGA		30s, 72°C 1min, n=1 72°C 5min ext	

Para la reacción de amplificación de las PCRs incluidas en el esquema PBRT se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

▪ **PCRs múltiples:**

Mix-PCR múltiple	Concentración	Volumen
Buffer de reacción (10 mM TRIS-HCL pH=8, 50 mM KCl)	10X	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µL
dNTPs	10 mM	1 µL
Pareja <i>Primer 1 (Forward / Reverse)</i>	10 µM	0,5 µL cada <i>primer</i>
Pareja <i>Primer 2 (Forward / Reverse)</i>	10 µM	0,5 µL cada <i>primer</i>
Pareja <i>Primer 3 (Forward / Reverse)</i>	10 µM	0,5 µL cada <i>primer</i>
Taq polimerasa (AmpliTaq Gold™)	1-2 U	0,5 µL
Agua grado PCR c.s.p 50 µL	-	37,5 µL
ADN de la muestra	100 ng	1 µL

▪ **PCRs simples:**

Mix-PCR simple	Concentración	Volumen
Buffer de reacción (10 mM TRIS-HCL pH=8, 50 mM KCl)	10X	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µL
dNTPs	10 mM	1 µL
Pareja <i>Primer 1 (Forward / Reverse)</i>	10 µM	0,5 µL cada <i>primer</i>
Taq polimerasa (AmpliTaq Gold™)	1-2 U	0,5 µL
Agua grado PCR c.s.p 50 µL	-	39,5 µL
ADN de la muestra	100 ng	1 µL

La visualización de los productos amplificados se realizó según se describe en el apartado de visualización. Para la interpretación de los resultados, se tuvo en cuenta tanto el número de bandas, como el tamaño de las bandas (pb) obtenido para cada muestra, ver Tabla 5).



### 8.2.3 Localización del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> en el genoma bacteriano.

Para determinar la localización del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> en el genoma bacteriano se utilizó la técnica de transferencia por *Southern blot* de geles con ADN cromosómico con una posterior hibridación mediante sondas específicas del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> (145). Los pasos del protocolo que se realizó se describen a continuación:

- Extracción del ADN plasmídico (método de *Barton*).
- Digestión del ADN, previamente embebido en bloques de agarosa, con el enzima S1-nucleasa (12U) durante 45 minutos a 37°C.
- Separación de los fragmentos de ADN digeridos mediante PFGE con las siguientes condiciones:

Tiempo Inicial	Tiempo Final	Tiempo total	T <sup>a</sup>	Voltaje
2,1 seg	54,1 seg	23 h	14°C	200 v

- Tinción y visualización del gel (Ver apartado visualización).
- Transferencia del ADN a una membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) mediante *Southern blot*, durante 48 h, utilizando NaOH 0,4 N como *buffer* de transferencia. Lavar la membrana con una solución de SSC 2X (Citrato sódico 30 mM, NaCl 0,3 M) y un lavado final con TrisHCl 0,5 M, pH=7,0. Fijar el ADN por exposición a la luz ultravioleta.
- Hibridación con sondas específicas de los genes *bla*<sub>VIM-1</sub> y del gen *IncHI2*. Estas sondas fueron obtenidas previamente mediante PCR a partir de los *primers* y condiciones descritos en las Tabla 3 (VIM) y Tabla 5 (*IncHI2*). Para el marcaje de las sondas se utilizó el kit comercial ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System siguiendo las

instrucciones del fabricante (GE Healthcare Bio-Sciences AB). La hibridación se llevó a cabo a una temperatura de 42°C durante 18 horas en el horno de hibridación Techne Hibridiser HB-1 (Techne Ltd, Cambridge, RU).

- La detección de la señal luminiscente se realizó mediante la adición de peroxidasa y de luminol (ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System, GE Healthcare Bio-Sciences). El revelado se realizó con el sistema digital de captura de imagen ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager (GE Healthcare Bio-Sciences).

Para la interpretación de los resultados se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- Hibridación positiva de la sonda *bla*<sub>VIM-1</sub> en alguno de los fragmentos obtenidos indicaría una localización plasmídica.
- Hibridación positiva de la sonda *bla*<sub>VIM-1</sub> y de la sonda IncHI2 en el mismo fragmento indicaría que el gen *bla*<sub>VIM-1</sub> está asociado a un plásmido del grupo de incompatibilidad IncHI2.
- Hibridación positiva de la sonda *bla*<sub>VIM-1</sub> y de la sonda IncHI2 en fragmentos diferentes indicaría que el gen *bla*<sub>VIM-1</sub> está asociado a un plásmido que no pertenece al grupo de incompatibilidad IncHI2.
- La ausencia de hibridación indicaría una localización cromosómica del gen *bla*<sub>VIM-1</sub>.

### 8.2.4 Conjugación bacteriana.

La transferencia *in vitro* del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> se realizó mediante conjugación bacteriana en medio líquido. El proceso de conjugación bacteriana consiste en el intercambio de material genético accesorio (integriones, plásmidos, transposones) mediante un contacto directo entre dos bacterias. Se utilizaron como células receptoras las cepas de *E. coli* BM21 que se caracteriza por ser resistente a ácido nalidíxico y rifampicina, lactosa positiva y estar libre de plásmidos y de *E. coli* J53 Az<sup>R</sup> que requiere los aminoácidos metionina y prolina para crecer

y es capaz de acidificar los carbohidratos sorbitol, rhamnosa, arabinosa y melódiosa, y se muestra inactivo frente a rafinosa, inositol, adonitol y sacarosa. Es sensible a todos los antimicrobianos, aunque se caracteriza por ser resistente a azida sódica (CMI = 250 mg/L). El protocolo de conjugación en medio líquido que se llevó a cabo fue el siguiente:

### 1º Día: Preparación del pre-inóculo

Inocular 1 colonia de una cepa portadora de *bla*<sub>VIM-1</sub> o cepa donadora y 1 colonia de la cepa receptora (*E. coli* BM21 / *E. coli* J53 Az<sup>R</sup>) en medio de cultivo líquido de LB e incubar 24h a 37°C.

### 2º Día: Preparación del inóculo

Inocular una colonia de la célula donadora en un tubo con medio de cultivo líquido LB (5 ml) y realizar la misma operación con la célula receptora e incubar a 37°C durante 18 h sin agitación.

### 3º Día: Conjugación bacteriana

Preparar un inóculo del cultivo anterior poniendo en contacto la cepa donadora y receptora en el mismo tubo en una proporción de 1:2 (1 ml de célula donadora, 2 ml de célula receptora) e incubar durante 6 h a 37°C sin agitación.

Se realizaron varias diluciones seriadas a partir del inóculo anterior:

- A. Cultivo puro → 100 µl
- B. Dilución  $10^{-1}$  → 10 µl cultivo puro + 100 µl H<sub>2</sub>O destilada.
- C. Dilución  $10^{-2}$  → 1 µl cultivo puro + 100 µl H<sub>2</sub>O destilada.
- D. Dilución  $10^{-3}$  → 0,1 µl cultivo puro + 100 µl H<sub>2</sub>O destilada.
- E. Dilución  $10^{-4}$  → 0,01 µl cultivo puro + 100 µl H<sub>2</sub>O destilada.
- F. Dilución  $10^{-5}$  → 0,001 µl cultivo puro + 100 µl H<sub>2</sub>O destilada.

Se plaquearon las diluciones preparadas anteriormente en medios de cultivos selectivos de MacConkey (Oxoid, Ltd.) suplementado con:

- Ceftazidima (2 mg/L) para seleccionar la célula donadora.
- Ceftazidima (2 mg/L) y rifampicina (100 µg/ml) para seleccionar las células transconjugantes.

### 4º Día: Obtención de transconjugantes

Las colonias crecidas en los medios selectivos se subcultivaron en los medios selectivos correspondientes para confirmar la obtención de transconjugantes.

### 5º Día: Confirmación de la transferencia genética

Se confirmó la presencia del gen *bla<sub>VIM-1</sub>* en las células transconjugantes obtenidas mediante extracción de ADN plasmídico (apartado extracción) y la amplificación del gen por PCR (apartado amplificación). Los transconjugantes obtenidos, se archivaron en glicerol al 40% a -20°C.

## 9. Secuenciación de Genoma Completo.

### 9.1 Selección de cepas.

Se seleccionaron 16 cepas de EPC para llevar a cabo la caracterización del genoma completo mediante secuenciación de nueva generación, ver Tablas 7-10:

- **1º Estudio (2007-2012):** Estudio epidemiológico y molecular de *E. cloacae* productor de carbapenemasa tipo *bla<sub>VIM-1</sub>*, se seleccionó la cepa **EC\_38** (Tabla 7).

- **2º Estudio (2009-2014):** Estudio epidemiológico y molecular de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa tipo *bla*<sub>OXA-48</sub>, se seleccionó la cepa **KP\_63** (Tabla 8).
- **3º Estudio (2009-2014):** Estudio molecular de *C. freundii* complex productor de carbapenemasa, se seleccionaron 11 cepas (Tabla 9).
- **4º Estudio (2016-2017):** Estudio molecular de *E. cloacae* complex, se seleccionaron 3 cepas (Tabla 10).

## 9.2 Tecnología de secuenciación.

### 9.2.1 Pirosecuenciación (454 Junior Roche).

Para la secuenciación de genoma completo de EC\_38 y KP\_63, procedentes del 1º y 2º estudio, respectivamente, se utilizó la plataforma GS Junior 454 (Roche Inc., Branford, CT, USA) cuya tecnología permitió detectar la liberación de pirofosfato mediante luminiscencia tras la incorporación de nucleótidos. La principal ventaja que ofreció esta plataforma fue la obtención de lecturas de gran tamaño ( $\approx 700$  pb), por ello su aplicación en la secuenciación de genomas bacterianos *de novo*. La secuenciación 454 se dio de baja en el año 2016 (146).

El procedimiento consistió en:

- Extracción de ADN genómico mediante *DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN) como se describe en el apartado de extracción.
- Preparación de la librería genómica con fragmentación de ADN de forma aleatoria (*shotgun*) mediante nebulización, reparación de extremos y unión de adaptadores.
- Amplificación mediante PCR en emulsión (emPCR).
- Secuenciación y detección de la señal mediante luminiscencia.

Una vez realizada la secuenciación, se llevó a cabo el proceso de “*base calling*” o, lo que es lo mismo, conversión de las imágenes obtenidas por el secuenciador en secuencias de ADN. Para ello se ejecutó el *software* GS Junior versión 2.7 que incluyó varias herramientas de análisis, entre ellas, el filtrado de secuencias por calidad, el corte o reparación de los extremos de las secuencias y el ensamblado *de novo*.

Los datos de las secuencias que proporcionó el secuenciador GS Junior 454 estaban contenidos en un tipo de archivo binario (.sff) que contenía la secuencia de nucleótidos, los parámetros de calidad y el flujograma con la información de la librería preparada.

### 9.2.2 Secuenciación por síntesis (MiSeq/HiSeq).

Las cepas de *C. freundii* (N=11) y de *E. cloacae* complex (N=3) incluidas en los estudios 3º y 4º, respectivamente, fueron secuenciadas con la tecnología de Illumina (Tabla 9 y 10). El principio de esta técnica se basó en la secuenciación por síntesis, donde las moléculas individuales de ADN se unieron a una superficie sólida o *flowcell* y los fragmentos de ADN se amplificaron mediante una PCR en puente (*bridge*) tras la adición de nucleótidos marcados con una sonda fluorescente. La *flowcell* tiene un formato de una única línea de secuenciación y es capaz de generar aproximadamente 15 Gb por carrera (147).

El procedimiento consistió en:

- Extracción de ADN genómico mediante *DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN) como se describe en el apartado de extracción.
- Preparación de la librería con fragmentación enzimática del ADN, reparación de los extremos y unión de adaptadores.
- Unión de los fragmentos de ADN a la *flowcell* que lleva unidos unos adaptadores complementarios y, posteriormente, la amplificación mediante PCR en puente.

- Secuenciación y detección de la señal fluorescente que emiten los nucleótidos al ir uniéndose a la cadena sintetizada.

Las librerías genómicas que se utilizaron para la secuenciación de las cepas de *C. freundii* fueron construidas utilizando el kit comercial TruSeq Nano DNA según las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en la plataforma MiSeq (Illumina, CA) obteniendo una profundidad de 30X con un tamaño de inserto de 350 pb y las lecturas tipo *paired-end* de 150 pb de tamaño. En el caso de las cepas de *E. cloacae* complex, las librerías se prepararon con el kit Nextera DNA y la secuenciación se realizó mediante el instrumento HiSeq2500 (Illumina, CA) para obtener una profundidad de 150X con un inserto de 300 pb y unas lecturas *paired-end* de 100 pb de longitud.

Los secuenciadores de Illumina utilizan un *pipeline* de análisis (*Firecrest* y *Bustard*) para llevar a cabo la transformación de las señales en secuencias. Los *rawdata* son almacenados en un fichero con formato FASTQ que es un formato de texto que contiene los datos de las secuencias y las puntuaciones de calidad de dichas secuencias.

### 9.3 Análisis bioinformático.

#### 9.3.1 Control de calidad de las secuencias (*Quality Control*).

El control de calidad de las secuencias es un paso previo que debe realizarse de forma obligatoria para asegurar que los datos cumplen unos requisitos mínimos de calidad. El primer paso que se llevó a cabo fue la visualización de la calidad de las secuencias y, para ello, se utilizó el *software* FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Una vez detectadas las secuencias de peor calidad se procedió a eliminarlas mediante la herramienta FASTX-toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) que además permite

recortar los extremos con peores calidades y eliminar los adaptadores que se han insertado en el proceso de secuenciación.

### 9.3.2 Ensamblado o reconstrucción de genomas.

Para la reconstrucción de los genomas de las cepas secuenciadas se llevó a cabo la estrategia de ensamblado *de novo* que es un proceso computacional basado en el alineamiento y la unión de los fragmentos cortos de ADN procedentes de la secuenciación para dar lugar a secuencias contiguas de mayor tamaño. El objetivo del ensamblado es hacer una reconstrucción de la secuencia original de la bacteria (148).

Las secuencias obtenidas con el secuenciador Junior 454 fueron ensambladas con Newbler v2.7, ensamblador *de novo* incluido en el *software* de análisis GS Junior versión 2.7 (Roche). Por otro lado, las secuencias proporcionadas por los secuenciadores de Illumina (MiSeq y HiSeq2500) después de ser filtradas se ensamblaron mediante el ensamblador SPAdes v. 3.6.2 (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>) que utiliza el algoritmo de *Bruijn Graph*, el cual, consiste en generar un grafo donde los nodos son los *k-mers* y las conexiones del grafo indican que los *k-mers* son adyacentes y solapan exactamente *k-1* nucleótidos. Este algoritmo se basa en la coincidencia exacta entre *k-mers* por lo que se encarga de corregir errores y resolver las repeticiones dando lugar a ensamblados de mayor calidad. Además, SPAdes incluye un *pipeline* con el que se detectan las secuencias plasmídicas y se ensamblan mediante la ejecución del parámetro *plasmidSPAdes* (149,150).

Después de la realización del ensamblado, tanto de las secuencias genómicas como de las plasmídicas, se utilizó el software QUAST v. 4.3 (<http://quast.sourceforge.net/quast>) que sirvió para examinar la calidad de las secuencias ensambladas a partir del cálculo de algunas métricas estadísticas, como por ejemplo, el cálculo del número total de *contigs* del ensamblado, el *contig* más largo, el porcentaje de la proporción GC, N50, L50, etc. (151).



### 9.3.3 Caracterización del genoma bacteriano.

#### A. Identificación de la especie bacteriana.

La técnica de MALDI-TOF no es capaz de identificar a nivel de especie las bacterias clasificadas como *C. freundii* complex y *E. cloacae* complex, por ello, se tuvo que confirmar la taxonomía de estas especies mediante la ejecución del programa JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws>) que está basado en realizar la comparación por pares de dos o más genomas bacterianos y de calcular el promedio de nucleótidos idénticos o *average nucleotide identity* (ANI) que se ha propuesto como una métrica para definir y clasificar las especies bacterianas (152).

#### B. Tipificación o estudio de la relación filogenética entre los aislados.

#### MLST

Para determinar el ST de cada cepa secuenciada se analizaron las secuencias de los 7 genes conservados que se incluyen en los esquemas de cada especie mediante la comparación con la base de datos de MLST de cada especie correspondiente y con la herramienta de MLST incluida en el servidor web del *Center for Genomic Epidemiology* (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

**Tabla 6.** Esquemas MLST

Especie	MLST	Esquema de genes
<i>E. cloacae</i>	<a href="https://pubmlst.org/ecloacae/">https://pubmlst.org/ecloacae/</a>	<i>dnaA, fusA, gyrB, leuS, pyrG, rplB, rpoB</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<a href="https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html">https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html</a>	<i>rpoB, gapA, mdh, pgi, phoE, infB, tonB</i>
<i>C. freundii</i>	<a href="https://pubmlst.org/cfreundii/">https://pubmlst.org/cfreundii/</a>	<i>aspC, clpX, fadD, mdh, arcA, dnaG, lysP</i>

### Estudio de los polimorfismos de nucleótido único (SNPs)

El estudio filogenético para determinar el número de SNPs existentes entre los genomas de las cepas secuenciadas se realizó mediante el servidor web CSI Phylogeny (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>). Las lecturas fueron alineadas con un genoma de referencia, *C. freundii* CFNIH1 ([CP007557](#)) y *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* ATCC 49162 ([AFHR00000000](#)), utilizando el programa Burrows-Wheeler aligner (BWA), seguido de una llamada a variantes mediante la herramienta SAMtools y la construcción de un árbol filogenético con el programa FastTree (153–155).

### C. Anotación del genoma bacteriano.

La anotación de los genomas y la predicción de los marcos de lectura abierta (ORF, *open reading frame*) se realizaron mediante el programa de anotación *Rapid Annotations using Subsystems Technology* ([RAST](#)) y a través de la ejecución del *pipeline* de anotación automática (PGAAP, *Prokariotic Genomes Automatic Annotation*) propuesto por *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (156,157).

Los proyectos de SGC de las cepas incluidas en este trabajo fueron depositados en la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank con los números de acceso que se describen en la Tabla 28 (Anexo: Resultados).

### D. Estudio del resistoma.

Para la detección de los principales determinantes de resistencia incluidos en el genoma de las bacterias se utilizaron diferentes programas que incluían bases de datos de genes de resistencia, tanto de localización cromosómica, como de genes de resistencia adquiridos mediante la transferencia de elementos móviles (plásmidos, transposones o integrones). Los programas que fueron implementados para el estudio del resistoma fueron:

- *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD, <https://card.mcmaster.ca/>)*: base de datos curada y revisada manualmente que incluye tanto mecanismos de resistencia intrínsecos como mecanismos de resistencia adquirida (158).
- *ResFinder 3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)*: base de datos que identifica genes de resistencia adquiridos y mutaciones presentes en genes cromosómicos. Una limitación de esta herramienta es que la detección de las mutaciones cromosómicas sólo se implementa para unas especies determinadas (159).

### E. Estudio del moviloma.

Para la caracterización de los elementos de transferencia horizontal se ejecutaron los siguientes servidores web:

- *The Integron Database (INTEGRALL, <http://integrall.bio.ua.pt/>)*: base de datos de libre acceso que 1.509 genes de integrasa y 8.562 genes cassettes. Permite comparar la secuencia problema con las secuencias de la base de datos y además clasificar el tipo de integrón si es una secuencia nueva (160).
- *PlasmidFinder 1.3 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)*: herramienta incluida en el *workflow* de análisis del *Center for Genomic Epidemiology* que permite identificar el tipo de replicón o grupo de incompatibilidad plasmídica de las especies pertenecientes al orden *Enterobacterales* (161).

El ensamblado de las secuencias de los integrones o plásmidos fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank usando la herramienta de BLAST. Posteriormente, las secuencias reconstruidas fueron visualizadas en el programa Geneious® 10.0.2.

### F. Estudio del viruloma.

Los determinantes de virulencia fueron analizados con la herramienta VirulenceFinder 1.2 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) y *virulence factors of pathogenic bacteria* (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) (162,163).

### 10. Análisis estadístico.

Se realizó un estudio estadístico descriptivo para analizar las características de los pacientes y el tipo de resistencia a carbapenémicos que presentaban los aislamientos. Las variables categóricas fueron analizadas en dos grupos, pacientes colonizados y/o infectados por EPC y *Enterobacterales* multirresistente no portadores de carbapenemasas, para las especies de *E. cloacae* y *K. pneumoniae* incluidos en los estudios 1º y 2º, respectivamente. Estos dos grupos fueron comparados para su asociación usando el test  $\chi^2$  de Pearson o el test exacto de Fisher. Las variables continuas fueron analizadas con la t Student. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los datos fueron almacenados y analizados con el paquete informático SPSS versión 21.0 para Windows (*Analytical Software*, St. Paul, MN USA).

**Tabla 7.** Cepas de *E. cloacae* (N=43) seleccionadas para su caracterización molecular.

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Tipificación	Estudio Integrón	Estudio Plásmidos		Secuenciación Genoma Completo		
					PFGE		Grupo Inc	Conjugación	Resistoma	Moviloma	Viruloma
EC_9	31/08/2007	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X				
EC_16	08/09/2008	Sangre	Bacteriemia	VIM-1	X	X		X			
EC_29	27/02/2009	Orina	ITU	VIM-1	X	X					
EC_34	07/05/2009	Espuito	Infección respiratoria	VIM-1	X	X					
EC_65	04/06/2010	Sangre	Bacteriemia	VIM-1	X	X					
EC_66	04/06/2010	Espuito	Infección respiratoria	VIM-1	X	X					
EC_80	01/02/2011	Orina	ITU	VIM-1	X	X					
EC_94	04/08/2011	Orina	ITU	VIM-1	X	X		X			
EC_101	09/12/2011	Orina	ITU	VIM-1	X	X					
EC_33	27/04/2009	Orina	ITU	VIM-1	X	X					
EC_38	25/05/2009	Sangre	Bacteriemia	VIM-1	X	X	X	X	X	X	X
EC_40	13/08/2009	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X				
EC_47	06/11/2009	Orina	ITU	VIM-1	X	X		X			
EC_99	25/10/2011	Absceso	Infección abdominal	VIM-1	X	X					
EC_49	17/11/2009	Orina	ITU	VIM-1	X	X		X			
EC_51	24/11/2009	Orina	ITU	VIM-1	X	X					
EC_54	14/12/2009	Sangre	Bacteriemia	VIM-1	X	X	X				
EC_81	21/03/2011	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X				

**Tabla 7.** Cepas de *E. cloacae* (N=43) seleccionadas para su caracterización molecular (Continuación).

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Tipificación	Estudio Integrón	Estudio Plásmidos		Secuenciación Genoma Completo		
					PFGE		Grupo Inc	Conjugación	Resistoma	Moviloma	Viruloma
EC_103	16/02/2012	Orina	ITU	VIM-1	X	X					
EC_27	03/02/2009	Orina	ITU	VIM-1	x	X					
EC_28	14/02/2009	Líquido orgánico	Infección abdominal	VIM-1	X	X	X				
EC_32	21/04/2009	Líquido orgánico	Infección abdominal	VIM-1	X	X		X			
EC_102	06/02/2012	EHQ	IHQ	VIM-1	X	X					
EC_53	17/12/2009	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X	X			
EC_56	25/01/2010	Orina	ITU	VIM-1	X	X		X			
EC_90	18/07/2011	Orina	ITU	VIM-1	X	X					
EC_4	22/05/2007	Sangre	Bacteriemia	VIM-1	X	X		X			
EC_39	20/07/2009	Sangre	Bacteriemia	VIM-1	X	X					
EC_106	05/03/2012	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X				
EC_78	12/01/2011	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X	X			
EC_24	05/12/2008	Sangre	Bacteriemia	VIM-1	X	X	X	X			
EC_67	07/06/2010	Exudado	IHQ	VIM-1	X	X	X	X			
EC_59	04/03/2010	Exudado	Colonización	VIM-1	X	X	X	X			
EC_44	13/10/2009	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X	X			
EC_18	09/10/2008	EHQ	IHQ	VIM-1	X	X	X	X			
EC_62	27/04/2010	Exudado	Colonización	VIM-1	X	X	X	X			

**Tabla 7.** Cepas de *E. cloacae* (N=43) seleccionadas para su caracterización molecular (Continuación).

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Tipificación	Estudio Integrón	Estudio Plásmidos		Secuenciación Genoma Completo		
					PFGE		Grupo Inc	Conjugación	Resistoma	Moviloma	Viruloma
EC-60	07/04/2010	Exudado	Colonización	VIM-1	X	X	X	X			
EC_35	11/05/2009	Sangre	Bacteriemia	KPC	X						
EC_76	29/10/2010	Orina	ITU	KPC	X						
EC_85	07/06/2011	Espuito	Infección respiratoria	KPC	X						
EC_107	20/03/2012	Espuito	Infección respiratoria	KPC	X						
EC_108	16/04/2012	Orina	ITU	KPC	X						
EC_37	17/05/2009	Sangre	Bacteriemia	VIM-2	X						

**Tabla 8.** Cepas de *K. pneumoniae* (N=97) seleccionadas para su caracterización molecular.

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Tipificación		Secuenciación Genoma Completo		
					PFGE	MLST	Resistoma	Moviloma	Viruloma
KP_1	01/06/2009	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_2	29/09/2009	Exudado	Infección Herida	VIM-1	X	X			
KP_3	26/11/2009	Exudado	Infección Herida	VIM-1	X				
KP_4	09/12/2009	Exudado	Colonización	VIM-1	X				
KP_5	17/05/2010	Orina	ITU	VIM-1	X	X			
KP_6	28/06/2010	Exudado	Bacteriemia	VIM-1	X				
KP_7	28/07/2010	Exudado	Infección Herida	VIM-1	X	X			
KP_8	11/09/2010	Sangre	Bacteriemia	VIM-1	X	X			
KP_9	12/10/2010	Exudado	Infección Herida	VIM-1	X				
KP_10	20/11/2010	Orina	Colonización	VIM-1	X				
KP_11	14/12/2010	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_12	05/01/2011	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_13	17/03/2011	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_14	23/05/2011	Exudado	Infección Herida	VIM-1	X				
KP_15	29/05/2011	Sangre	Infección respiratoria	VIM-1	X				
KP_16	06/06/2011	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_17	07/06/2011	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_18	12/07/2011	Exudado	Colonización	VIM-1	X				



**Tabla 8.** Cepas de *K. pneumoniae* (N=97) seleccionadas para su caracterización molecular (Continuación).

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Tipificación		Secuenciación Genoma Completo		
					PFGE	MLST	Resistoma	Moviloma	Viruloma
KP_19	19/07/2011	Exudado	Colonización	VIM-1	X				
KP_20	19/07/2011	Exudado	Colonización	VIM-1	X	X			
KP_21	26/07/2011	Catéter	Infección abdominal	VIM-1	X				
KP_22	26/07/2011	Exudado	Colonización	VIM-1	X				
KP_23	10/08/2011	Sangre	ITU	VIM-1	X				
KP_24	16/08/2011	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_25	03/04/2012	Exudado	Infección Herida	VIM-1	X				
KP_26	16/04/2012	Exudado	Infección Herida	VIM-1	X				
KP_27	20/04/2012	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_28	03/05/2012	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_29	16/05/2012	Exudado	Infección Herida	OXA-48	X				
KP_30	18/10/2012	Exudado	Colonización	OXA-48	X	X			
KP_31	26/10/2012	Exudado	Colonización	VIM-1	X				
KP_32	13/11/2012	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_33	12/12/2012	Exudado	Colonización	VIM-1	X				
KP_34	20/12/2012	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_35	28/12/2012	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_36	11/02/2013	Orina	ITU	VIM-1	X				

**Tabla 8.** Cepas de *K. pneumoniae* (N=97) seleccionadas para su caracterización molecular (Continuación).

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Tipificación		Secuenciación Genoma Completo		
					PFGE	MLST	Resistoma	Moviloma	Viruloma
KP_37	05/03/2013	Exudado	Colonización	VIM-1	X				
KP_38	21/03/2013	Orina	Infección Herida	OXA-48	X				
KP_39	22/04/2013	Catéter	Meningitis	OXA-48	X				
KP_40	01/07/2013	Orina	ITU	OXA-48	X	X			
KP_41	13/07/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_42	25/07/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_43	25/07/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_44	26/07/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_45	31/07/2013	Sangre	Bacteriemia	KPC	X				
KP_46	01/08/2013	Exudado	Infección Herida	VIM-1	X				
KP_47	06/08/2013	Orina	Colonización	OXA-48	X	X			
KP_48	07/08/2013	Orina	ITU	VIM-1	X				
KP_49	08/08/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_50	09/08/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_51	12/08/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_52	13/08/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_53	20/08/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_54	24/08/2013	Orina	Colonización	OXA-48	X				

**Tabla 8.** Cepas de *K. pneumoniae* (N=97) seleccionadas para su caracterización molecular (Continuación).

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Tipificación		Secuenciación Genoma Completo		
					PFGE	MLST	Resistoma	Moviloma	Viruloma
KP_55	30/08/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_56	30/08/2013	Exudado	Infección Herida	OXA-48	X				
KP_57	04/09/2013	Sangre	Bacteriemia	OXA-48	X				
KP_58	05/09/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_59	01/10/2013	Exudado	Bacteriemia	OXA-48	X				
KP_60	01/10/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_61	11/10/2013	Sangre	Bacteriemia	OXA-48	X				
KP_62	15/10/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_63	24/10/2013	Sangre	Bacteriemia	OXA-48	X	X	X	X	X
KP_64	13/11/2013	Sangre	Bacteriemia	OXA-48	X				
KP_65	18/11/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_66	22/11/2013	Sangre	Bacteriemia	OXA-48	X				
KP_67	22/11/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_68	25/11/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_69	26/11/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_70	27/11/2013	Orina	ITU	OXA-48	X	X			
KP_71	28/11/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_72	09/12/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				

**Tabla 8.** Cepas de *K. pneumoniae* (N=97) seleccionadas para su caracterización molecular (Continuación).

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Tipificación		Secuenciación Genoma Completo		
					PFGE	MLST	Resistoma	Moviloma	Viruloma
KP_73	10/12/2013	Orina	Bacteriemia	OXA-48	X				
KP_74	11/12/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_75	12/12/2013	Exudado	ITU	OXA-48	X				
KP_76	13/12/2013	Exudado	Infección Herida	OXA-48	X				
KP_77	13/12/2013	Aspirado bronquial	Bacteriemia	OXA-48	X				
KP_78	17/12/2013	Exudado	Infección Herida	OXA-48	X				
KP_79	26/12/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_80	28/12/2013	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_81	30/12/2013	Exudado	Colonización	VIM-1	X				
KP_82	31/12/2013	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_83	02/01/2014	Exudado	Infección Herida	OXA-48	X	X			
KP_84	15/01/2014	Exudado	Infección Herida	OXA-48	X				
KP_85	16/01/2014	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_86	20/01/2014	Aspirado bronquial	Infección respiratoria	OXA-48	X				
KP_87	21/01/2014	Exudado	Infección Herida	OXA-48	X				
KP_88	28/01/2014	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_89	31/01/2014	Exudado	Colonización	OXA-48	X				
KP_90	03/02/2014	Orina	ITU	OXA-48	X				

**Tabla 8.** Cepas de *K. pneumoniae* (N=97) seleccionadas para su caracterización molecular (Continuación).

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Tipificación		Secuenciación Genoma Completo		
					PFGE	MLST	Resistoma	Moviloma	Viruloma
KP_91	03/02/2014	Exudado	Infección Herida	OXA-48	X				
KP_92	14/02/2014	Aspirado bronquial	Infección respiratoria	OXA-48	X				
KP_93	16/03/2014	Sangre	Bacteriemia	OXA-48	X				
KP_94	08/01/2014	Espudo	Infección respiratoria	OXA-48	X				
KP_95	08/01/2014	Orina	ITU	OXA-48	X				
KP_96	23/01/2014	Exudado	Infección Herida	OXA-48	X				
KP_97	27/01/2014	Exudado	Colonización	OXA-48	X				

**Tabla 9.** Cepas de *C. freundii* (N=11) seleccionadas para su caracterización molecular.

ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	PFGE	Secuenciación Genoma Completo			
						MLST	SNPs	Resistoma	Moviloma
CF_1	20/08/2009	Orina	ITU	KPC-2	X	X	X	X	X
CF_4	02/09/2010	Orina	Infección Herida	VIM-1	X	X	X	X	X
CF_6	19/06/2012	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X	X	X
CF_7	02/10/2012	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X	X	X
CF_8	12/02/2013	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X	X	X
CF_10	29/05/2013	Exudado	Colonización	VIM-1	X	X	X	X	X
CF_11	08/06/2013	Espuito	Infección respiratoria	VIM-1 / KPC-2	X	X	X	X	X
CF_12	01/07/2013	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X	X	X
CF_13	26/08/2013	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X	X	X
CF_14	20/06/2014	Orina	ITU	VIM-1	X	X	X	X	X
CF_15	14/07/2014	Exudado	Colonización	VIM-1	X	X	X	X	X

**Tabla 10.** Cepas de *E. hormaechei* (N=3) seleccionadas para su caracterización molecular.

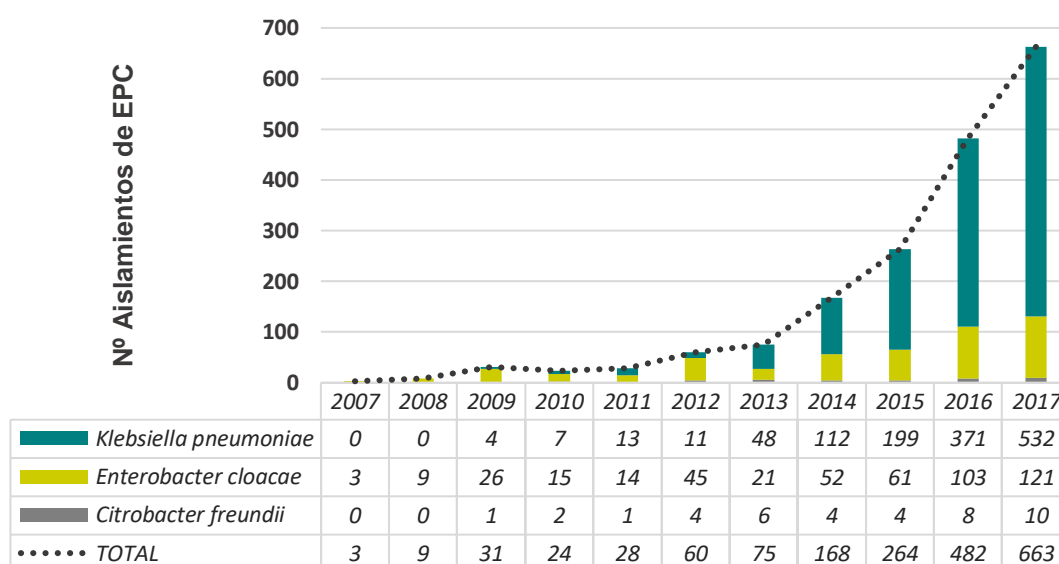
ID	Fecha de aislamiento	Tipo Muestra	Tipo Infección / Colonización	Carbapenemasa	Secuenciación Genoma Completo			
					MLST	SNPs	Resistoma	Moviloma
EH_1	03/08/2016	Orina	ITU	NDM-7	X	X	X	X
EH_2	17/01/2017	Orina	ITU	NDM-7	X	X	X	X
EH_3	21/02/2017	Exudado	Infección piel y partes blandas	NDM-7	X	X	X	X

## RESULTADOS



## 1. Evolución temporal de los aislamientos de EPC durante un periodo de 10 años en el Hospital Universitario 12 de Octubre.

Durante los 10 años de estudio, se obtuvieron 9.113 aislamientos clínicos de *Enterobacterales* pertenecientes a las especies *K. pneumoniae*, *C. freundii* y *E. cloacae*, que son las especies incluidas en este estudio. De éstas, 66% fueron identificadas como *K. pneumoniae*, el 26,5% como *E. cloacae* y 7,5% como *C. freundii*. Un total de 1.807 de los aislamientos presentaron sensibilidad disminuida a los carbapenémicos, de los cuales, 1.297 aislamientos fueron de *K. pneumoniae*, 470 de *E. cloacae* y 40 de *C. freundii* (Figura-17).

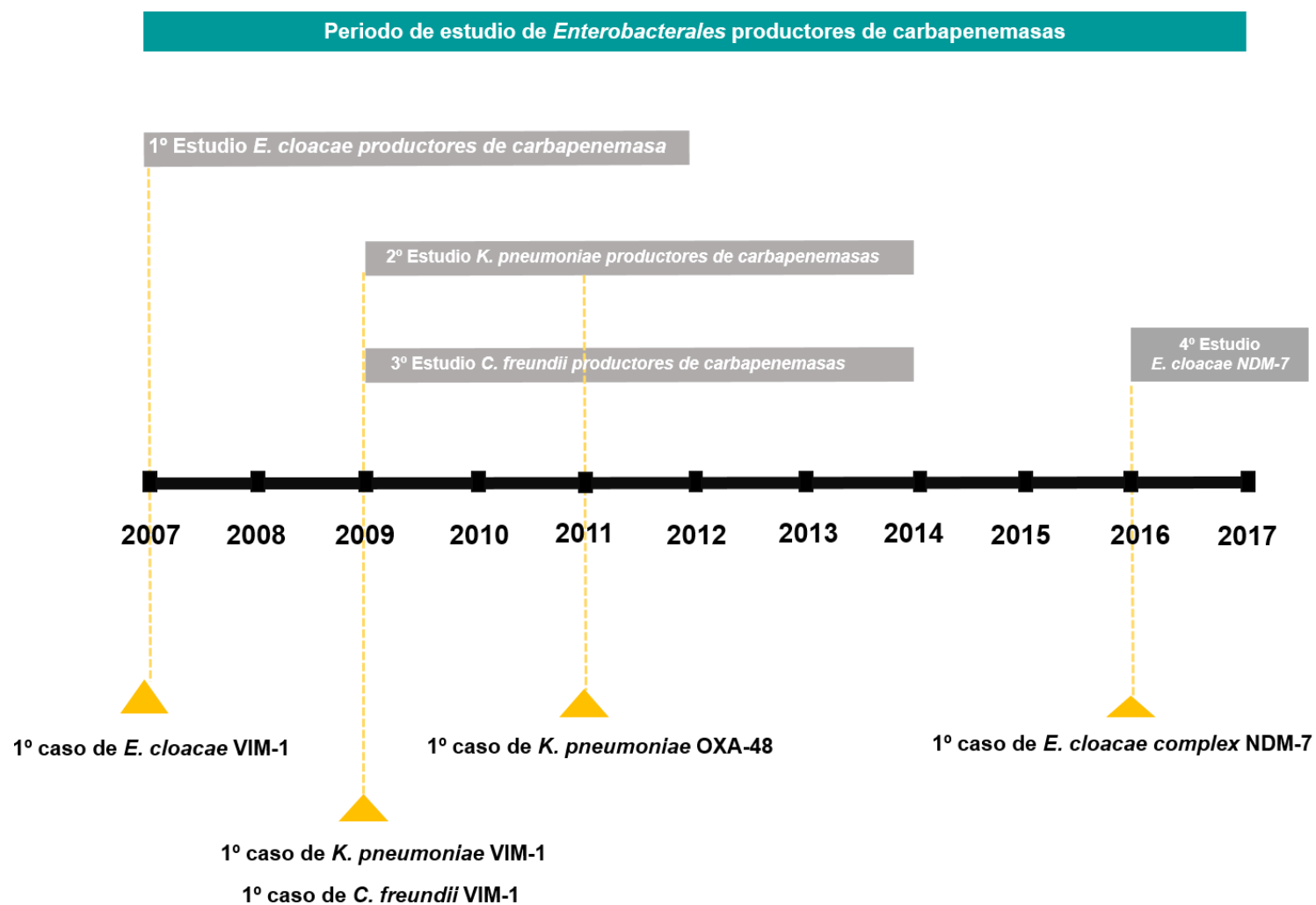


**Figura-17.** Evolución temporal de las infecciones/colonizaciones de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas en el H12O.

Además de las especies anteriormente mencionadas, se aislaron otras especies de EPC como, *E. coli*, *K. oxytoca* y *S. marcescens*, que fueron aisladas de forma minoritarias y que causaron casos puntuales en nuestro hospital (164). Por este motivo, no se han tenido en cuenta para los resultados de esta tesis por no estar dentro de los objetivos de esta.

Desde que se detectó el primer caso de *E. cloacae* con sensibilidad disminuida a carbapenémicos en el H12O en 2007, se ha observado un incremento gradual en el aislamiento de diferentes especies de EPC que causaron infecciones/colonizaciones en pacientes ingresados en diferentes servicios clínicos del hospital. Debido a la importancia que tienen las carbapenemasas como principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en *Enterobacterales* y su papel en la diseminación y la propagación entre diferentes especies bacterianas consideradas clones de alto riesgo, se quiso estudiar el tipo de carbapenemasa que albergaba cada especie, así como el vehículo de transferencia horizontal al que se encontraba asociado para poder describir la situación epidemiológica acontecida en el H12O.

Los resultados de esta tesis doctoral se incluyeron dentro de 4 estudios que correspondieron a determinados brotes que surgieron en el H12O durante periodos de tiempo diferentes y que se fueron abordando según fueron emergiendo (Figura-18).



**Figura-18.** Distribución temporal de los casos de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas en el H12O incluidos en este estudio.

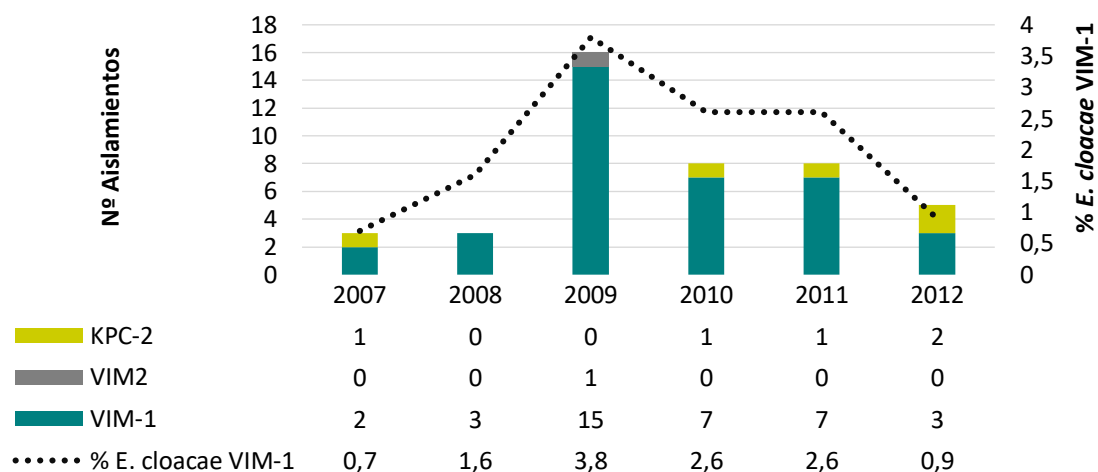
## 2. Estudio epidemiológico y molecular de los aislamientos de *E. cloacae* productores de carbapenemasa durante 2007-2012.

### 2.1 Características generales.

Durante el periodo 2007 a 2012, se detectaron 1.717 aislamientos de *E. cloacae*, de los cuales 112 (6,5%) mostraron sensibilidad disminuida a los antibióticos carbapenémicos. De las 112 cepas, 73 cepas estuvieron disponibles en el cepario del laboratorio de microbiología del H12O y fueron seleccionadas para la realización del estudio epidemiológico y la caracterización molecular.

### 2.2 Detección de carbapenemasa.

El estudio de carbapenemasas se llevó a cabo mediante el THM en las 73 cepas seleccionadas y todas ellas fueron positivas. La detección de carbapenemasas se confirmó mediante PCR convencional y posterior secuenciación del producto amplificado. Se utilizaron como dianas los tipos de carbapenemasas más frecuentemente encontrados en ese periodo de tiempo (2007-2012), entre ellas, las carbapenemasas de clase A (*bla*<sub>KPC</sub>), MBL (*bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-2</sub>) y clase D (*bla*<sub>OXA-48</sub>). Se detectó la presencia de carbapenemasa en 43 aislamientos (58,9%), de los cuales, 37 fueron VIM-1, 5 fueron KPC-2 y 1 aislamiento fue VIM-2. El mayor número de cepas productoras de carbapenemasa se observó en el año 2009 y los aislamientos de *E. cloacae* productores de carbapenemasa tipo VIM-1 fueron los más prevalentes. La distribución anual de *E. cloacae* productores de VIM-1 a lo largo del periodo de estudio se representa en la Figura-19.



**Figura-19.** Distribución anual del Nº de aislamientos de *E. cloacae* productores de carbapenemasa.

### 2.3 Perfil de resistencia de los aislamientos de *E. cloacae* multirresistente.

El fenotipo de susceptibilidad a los antimicrobianos de los 43 aislamientos de *E. cloacae* productores de carbapenemasa, según los puntos de corte recomendados por CLSI 2014 fue el que se muestra en la Tabla 11(165).

**Tabla 11.** Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *E. cloacae* productores de carbapenemasas.

Antibióticos	CMI (mg/L)	N=43 Totales Nº (R %)	N=38 VIM Nº (R %)	N=5 KPC-2 Nº (R %)
<b>β-lactámicos</b>				
Cefepime	> 8	41 (95,3)	36 (94,7)	5 (100)
Aztreonam	> 16	23 (53,5)	18 (47,3)	5 (100)
Ertapenem	> 4	41 (95,3)	37 (97,3)	4 (80)
Imipenem	> 8	41 (95,3)	36 (94,7)	5 (100)
Meropenem	> 8	37 (86,0)	33 (86,8)	4 (80)
<b>Aminoglucósidos</b>				
Gentamicina	> 16	20 (46,5)	20 (52,6)	0 (0)
Tobramicina	> 16	31 (72,1)	31 (81,6)	0 (0)
Amicacina	> 16	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Quinolonas</b>				
Ciprofloxacino	> 2	41 (95,3)	36 (94,7)	5 (100)
<b>Trimetoprim/sulfametoxazol</b>				
Cotrimoxazol	> 4/16	36 (83,7)	36 (94,7)	0 (0)
<b>Tetraciclinas</b>				
Tigeciclina	> 2	0 (0)	0 (0)	0 (0)

La mayoría de los aislamientos presentaban resistencia a otros antimicrobianos pertenecientes a otras familias diferentes a β-lactámicos. Todos los aislamientos se mantuvieron sensibles a amicacina y tigeciclina.

## 2.4 Características clínicas de los pacientes.

La mediana de edad de los pacientes con infección/colonización por *E. cloacae* VIM-1 fue de 62 años (rango: 35 a 83 años). El 59,9% de los pacientes eran varones y tuvieron una estancia de hospitalización con una mediana de 30 días (Tabla 12). Al comparar las características clínicas de los pacientes afectados por *E. cloacae* con sensibilidad disminuida a carbapenémicos (VIM-1 positivo vs. VIM-1 negativo), se observó que los pacientes con aislamientos de *E. cloacae* productor de VIM-1 procedían con más frecuencia del servicio de

Nefrología del H12O (43,2% vs. 10,0%;  $p = 0,002$ ), presentaron como factor de riesgo insuficiencia renal crónica (43,2% vs. 10,0%;  $p = 0,002$ ), fueron portadores de catéter doble jota (29,7% vs. 3,3%;  $p = 0,005$ ) y padecieron con mayor frecuencia infecciones del tracto urinario (51,3% vs. 13,3%;  $p = 0,001$ ) (Tabla 12).

**Tabla 12.** Características clínicas de los pacientes infectados/colonizados por *E. cloacae*.

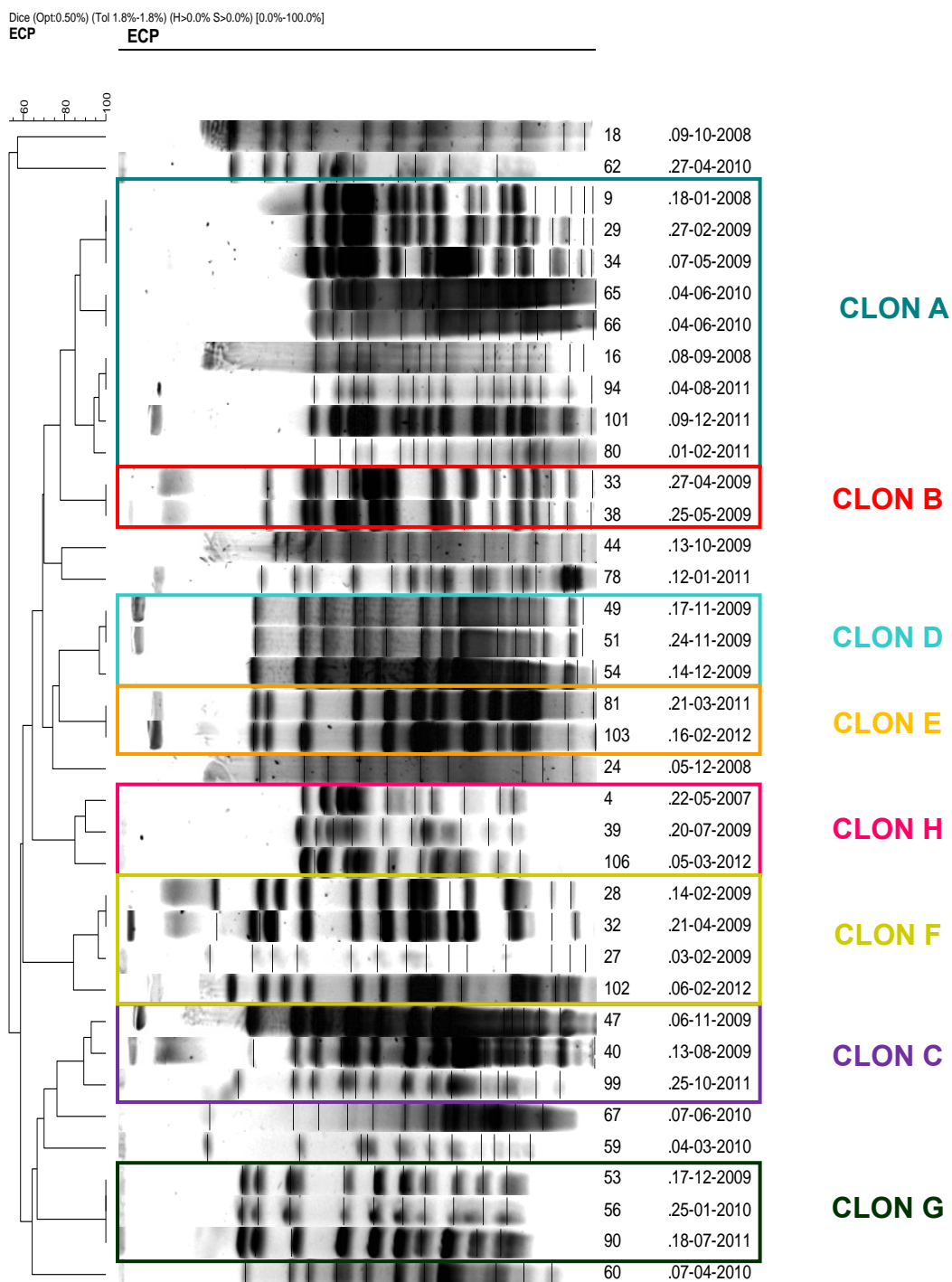
Características	Pacientes con <i>E. cloacae</i> VIM-1 positivo N=37, N (%)	Pacientes con <i>E. cloacae</i> carbapenemasa negativo* N=30, N (%)	<i>p</i>
Mediana Edad (años), Rango	62 (35-83)	66,5 (29-91)	0,169
Sexo Masculino	22 (59,5)	14 (46,7)	0,303
Mediana Estancia hospitalaria (días), Rango	30 (1-152)	29 (1-78)	0,501
<b>Servicio Diagnóstico</b>			
Nefrología	16 (43,2)	3 (10,0)	0,002
Unidades quirúrgicas	5 (13,5)	13 (43,4)	0,006
Medicina Interna	6 (16,2)	3 (10,0)	0,465
Hematología	4 (10,9)	0	-
UCIs	2 (5,4)	4 (13,3)	0,265
Digestivo	2 (5,4)	2 (6,7)	0,831
Oncología	1 (2,7)	4 (13,3)	0,102
Urología	1 (2,7)	1 (3,3)	0,882
<b>Factores de riesgo</b>			
Diabetes Mellitus	7 (19,0)	7 (23,3)	0,664
Insuficiencia renal crónica	16 (43,2)	3 (10,0)	0,002
Tumor de órgano sólido	17 (46,0)	16 (53,3)	0,554
Trasplante de órgano sólido	15 (40,5)	7 (23,3)	0,140
<b>Procedimientos quirúrgicos</b>	27 (73,0)	26 (86,6)	0,175
Catéter central	20 (54,0)	22 (73,3)	0,107
Sonda uretral	11 (29,7)	1 (3,3)	0,005
<b>Tipo de infección</b>			
Infección urinaria	19 (51,3)	4 (13,3)	0,001
Bacteriemia	7 (19,0)	17 (56,6)	0,001
Infección intraabdominal	3 (8,1)	5 (16,7)	0,289
Infección de herida	6 (16,2)	3 (10,0)	0,465
Infección respiratoria	2 (5,4)	1 (3,4)	0,688
<b>Muerte durante la hospitalización</b>	9 (24,3)	8 (26,7)	0,829

\*Los pacientes infectados con *E. cloacae* VIM-2 y KPC-2 fueron excluidos de esta comparación.

### **2.5 Estudio de tipificación molecular de los aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM-1.**

El estudio de tipificación molecular realizado mediante PFGE de los aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM-1 mostró una gran diversidad de patrones electroforéticos. El análisis de las 37 cepas reveló la presencia de 16 patrones, de los cuales, 29 aislamientos (78,4%) fueron agrupados dentro de los 8 patrones mayoritarios (A=9, B=2, C=3, D=3, E=2, F=4, G=3 y H=3) y los 8 aislamientos restantes presentaron patrones electroforéticos únicos (Figura-20). El patrón electroforético que representó al mayor número de aislamientos fue denominado como “Clon A”, fue detectado inicialmente en 2007 y persistió en el H12O durante un periodo de 5 años. El resto de los aislamientos que pertenecieron a diferentes clones se distribuyeron a lo largo de todo el periodo de estudio. La distribución temporal de los clones a lo largo del periodo de estudio se representa en la Figura-20.





**Figura-20.** Dendrograma de *E. cloacae* productor de carbapenemasa VIM-1.

La mayoría de los aislamientos se detectaron en el año 2009, con un total 15 (40,5%) pacientes infectados/colonizados por *E. cloacae* productores de VIM-1 (Figuras-20 y 24). Además, el análisis de la procedencia de los clones detectados mediante PFGE mostró una distribución espacial dispersa, a excepción del clon B, que fue detectado en Cirugía General, y los clones D y G, detectados únicamente en el servicio de Nefrología (Tabla 13).

**Tabla 13.** Características Microbiológicas y Moleculares de los aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM-1.

ID. Aislado	Fecha	Servicio Diagnóstico	Tipo de Infección	PFGE	Conjugación	Tipo de Integrón (5' -> 3')
EC-9	31/08/2007	Nefrología	Infección Tracto Urinario	A	NR	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-16	08/09/2008	Hematología	Bacteriemia	A	Negativo	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-29	27/02/2009	Medicina Interna	Infección Tracto Urinario	A	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-34	07/05/2009	Oncología	Infección Respiratoria	A	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-65	04/06/2010	Medicina Interna	Bacteriemia	A	NR	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-66	04/06/2010	Medicina Interna	Infección Respiratoria	A	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-80	01/02/2011	Nefrología	Infección Tracto Urinario	A	NR	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-94	04/08/2011	Medicina Interna	Infección Tracto Urinario	A	Negativo	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-101	09/12/2011	Hematología	Infección Tracto Urinario	A	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-33	27/04/2009	Cirugía General	Infección Tracto Urinario	B	NR	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-38	25/05/2009	Cirugía General	Bacteriemia	B	Positivo	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-40	13/08/2009	UCI	Infección Tracto Urinario	C	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-47	06/11/2009	Nefrología	Infección Tracto Urinario	C	Negativo	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-99	25/10/2011	Urología	Infección Intraabdominal	C	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-49	17/11/2009	Nefrología	Infección Tracto Urinario	D	Negativo	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-51	24/11/2009	Nefrología	Infección Tracto Urinario	D	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-54	14/12/2009	Nefrología	Bacteriemia	D	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-81	21/03/2011	Nefrología	Infección Tracto Urinario	E	NR	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-103	16/02/2012	Digestivo	Infección Tracto Urinario	E	NR	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-27	03/02/2009	Nefrología	Infección Tracto Urinario	F	NR	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-28	14/02/2009	Nefrología	Infección Intraabdominal	F	NR	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-32	21/04/2009	Cirugía General	Infección Intraabdominal	F	Positivo	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-102	06/02/2012	Nefrología	Infección de Herida	F	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-53	17/12/2009	Nefrología	Infección Tracto Urinario	G	Positivo	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-56	25/01/2010	Nefrología	Infección Tracto Urinario	G	Positivo	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-90	18/07/2011	Nefrología	Infección Tracto Urinario	G	NR	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-4	22/05/2007	Cirugía General	Bacteriemia	H	Negativo	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-39	20/07/2009	Medicina Interna	Bacteriemia	H	NR	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-106	05/03/2012	Nefrología	Infección Tracto Urinario	H	NR	<i>aacA4-aadA1</i>

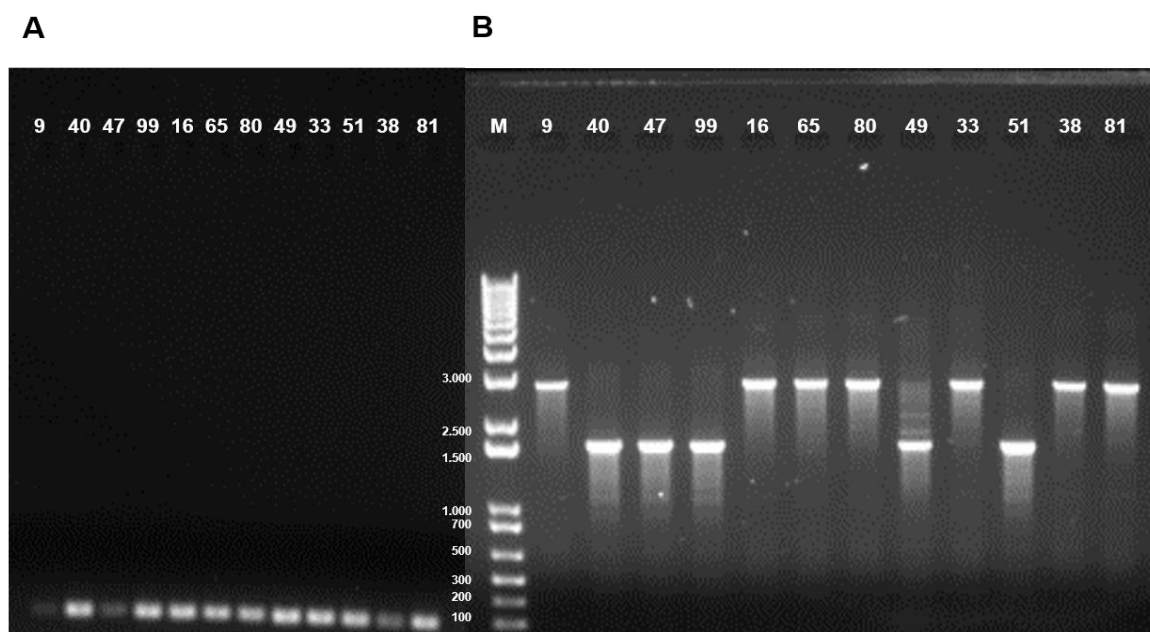
NR: No realizado

**Tabla 13.** Características Microbiológicas y Moleculares de los aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM-1 (Continuación).

ID. Aislado	Fecha	Servicio Diagnóstico	Tipo de Infección	PFGE	Conjugación	Tipo de Integrón (5'→3')
EC-78	12/01/2011	Nefrología	Infección Tracto Urinario	I	Negativo	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-24	05/12/2008	Medicina Interna	Bacteriemia	J	Negativo	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-67	07/06/2010	Digestivo	Infección de Herida	K	Negativo	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-59	04/03/2010	UCI	Infección de Herida	L	Negativo	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-44	13/10/2009	Hematología	Infección Tracto Urinario	M	Positivo	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-18	09/10/2008	Nefrología	Infección de Herida	N	Positivo	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>
EC-62	27/04/2010	Cirugía General	Infección de Herida	O	Positivo	<i>aacA4-aadA1</i>
EC-60	07/04/2010	Hematología	Infección de Herida	P	Negativo	<i>aacA4-dfrB1-aadA1-catB2</i>

## 2.6 Caracterización del entorno genético de *bla*<sub>VIM-1</sub>.

El estudio del entorno genético de la carbapenemasa VIM-1 se llevó a cabo mediante la realización de PCR solapantes de la región *upstream* y *downstream* del gen *bla*<sub>VIM-1</sub>.



**Figura-21.** Panel A: PCR *upstream* de *bla*<sub>VIM-1</sub>. Panel B: PCR *downstream* de *bla*<sub>VIM-1</sub>.

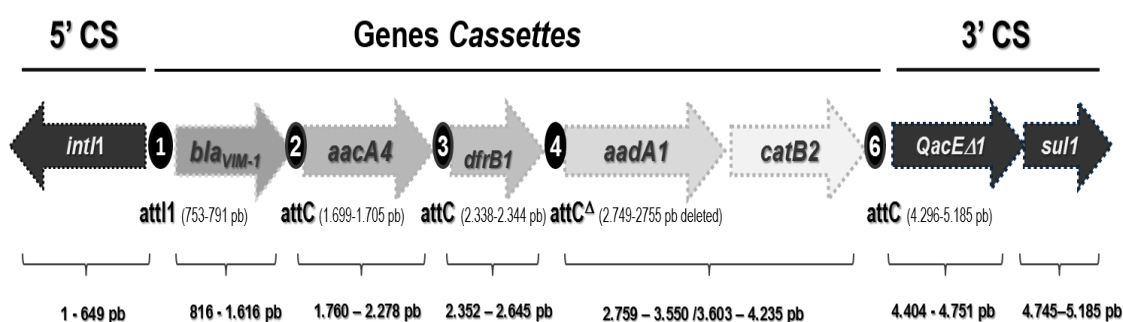
En la Figura-21 se muestran los resultados obtenidos de la PCR de entornos que se realizó en las cepas EC\_9, EC\_16, EC\_33, EC\_38, EC\_40, EC\_47, EC\_49, EC\_51, EC\_65, EC\_80, EC\_81, EC\_99. En el panel A, se representan las bandas obtenidas tras la realización de la PCR dirección *upstream* del gen *bla*<sub>VIM-1</sub>. Los tamaños de las bandas obtenidas fueron de 100 pb, aproximadamente, comparado con el marcador 1kb plus ADN *Ladder*, lo que mostró que no existió ningún *cassette* entre el gen de la integrasa y el gen *bla*<sub>VIM-1</sub>. El panel B muestra las bandas resultantes de la PCR dirección *downstream* del gen *bla*<sub>VIM-1</sub>. En este caso, se obtuvieron dos tipos de bandas con tamaños diferentes. En las cepas EC\_9, EC\_16, EC\_33, EC\_38, EC\_65, EC\_80, EC\_81 se amplificó una secuencia de un tamaño aproximado

de 3.000 pb y en las cepas EC\_40, EC\_47, EC\_49, EC\_51 y EC\_99 se amplificó una secuencia de un tamaño menor (1.500 pb). La presencia de bandas de tamaños entre 1.500 – 3.000 pb nos reveló que varios genes *cassettes* estaban presentes entre el gen *bla<sub>VIM-1</sub>* y el gen *qacΔE1*.

La caracterización de los entornos genéticos del gen *bla<sub>VIM-1</sub>* se llevó a cabo en las 37 cepas de *E. cloacae* productora de *bla<sub>VIM-1</sub>*. El análisis de las secuencias con BLAST y la comparación con la base de datos INTEGRALL nos dio como resultado dos tipos de integrones cuya estructura se describe a continuación:

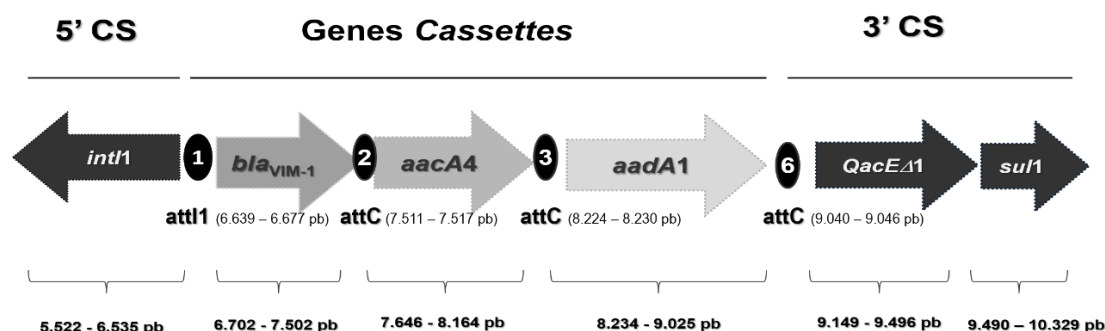
- In624 (tamaño 4kb) → *int1*–*bla<sub>VIM-1</sub>*–*aacA4*–*dfrB1*–*aadA1*–*catB2*–*qacEΔ1*/*sul1*
- In488 (tamaño 2kb) → *int1*–*bla<sub>VIM-1</sub>*–*aacA4*–*aadA1*–*qacEΔ1*/*sul1*

El integrón In624 fue detectado en 18 cepas. Este integrón se caracterizó por presentar una región variable que estaba compuesta por 5 determinantes de resistencia que afectaron a los antibióticos β-lactámicos, aminoglucósidos y a sulfamidas e inhibidores de la enzima *dihidrofolato reductasa*. El análisis de la secuencia mostró que la región attC del gen *aadA1* se encontraba truncada (Figura-22).



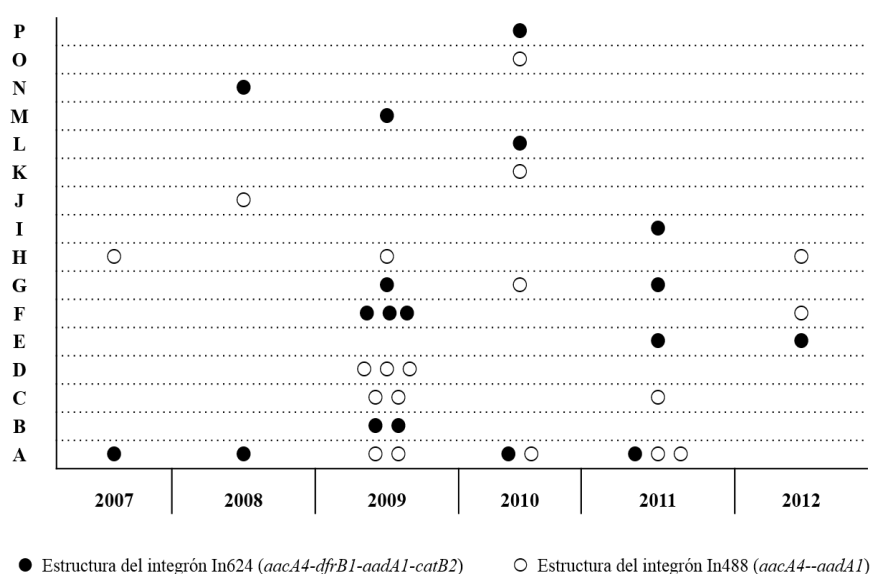
**Figura-22.** Estructura del Integrón In624 ([GQ422827](#)).

Por otra parte, el integrón In488, se detectó en 19 cepas y la región variable estaba formada por 3 genes de resistencia, su estructura fue de un tamaño menor (2 kb) que el integrón In624 (Figura-23).



**Figura-23.** Estructura del Integrón In488 ([GQ422826](#)).

La mayoría de los clones se asociaron con un tipo de integrón en particular, a excepción de los clones A, F, y G que se asociaron con los dos tipos de integrones (In624 o In488) (Tabla 13, Figura-24).



**Figura-24.** Distribución temporal de los aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM-1 de acuerdo con los patrones electroforéticos y la estructura del Integrón.

### 2.7 Análisis de plásmidos.

El estudio de plásmidos para determinar el grupo de incompatibilidad se realizó mediante las PCRs múltiples y las PCRs simples incluidas en el protocolo PBRT (98,144). Se analizaron 21 cepas que fueron seleccionadas por ser representantes de cada uno de los clones obtenidos por PFGE. Todas las cepas albergaron un plásmido clasificado dentro del grupo de incompatibilidad IncHI2. En 17 cepas, además del plásmido IncHI2, también se detectó el replicón FIA y FIB (Tabla 14).



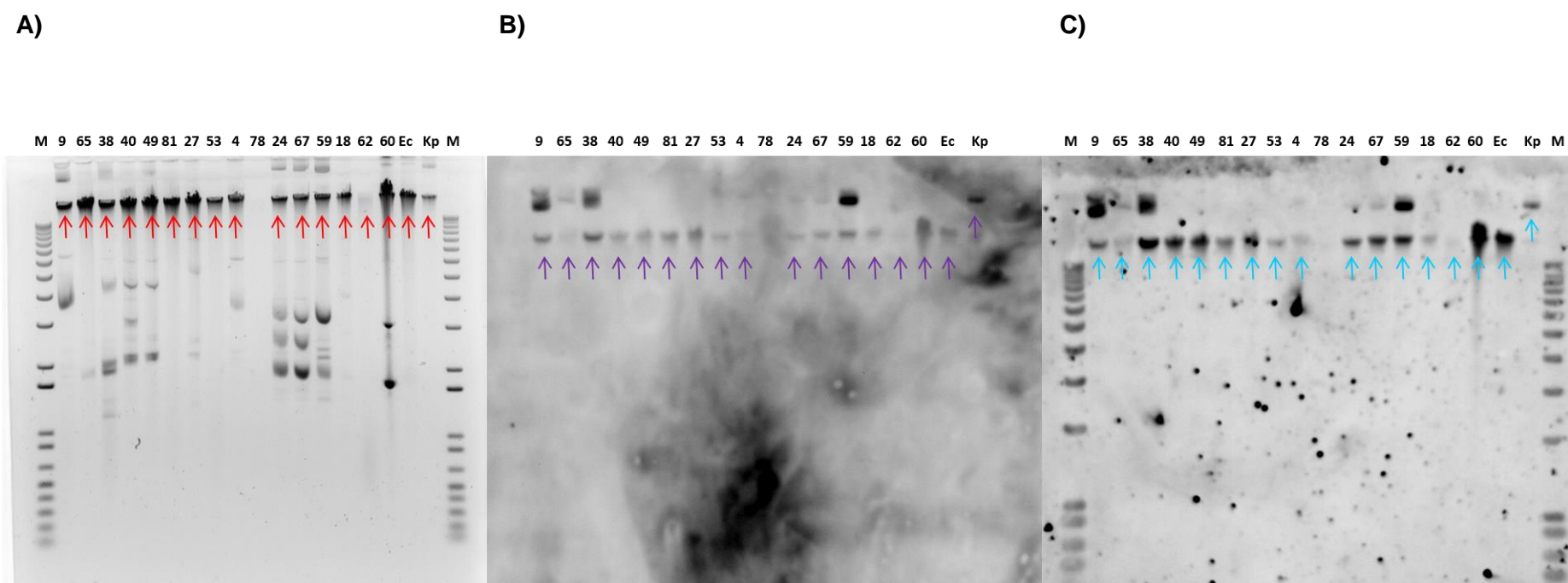
**Tabla 14.** Resultados de clasificación plasmídica en función al grupo de incompatibilidad por PBRT de los aislamientos de *E. cloacae*.

ID	PFGE	Grupo Inc	Multiplex PCR															Simplex PCR		
			1 <sup>a</sup>			2 <sup>a</sup>			3 <sup>a</sup>			4 <sup>a</sup>			5 <sup>a</sup>			F	K	B/O
			HI 1	HI 2	I1	X	L/M	N	FI A	FI B	W	Y	P	FIC	A/C	T	FIIA			
			471pb	644pb	139pb	376pb	785pb	559pb	462pb	702pb	242pb	765pb	534pb	262pb	465pb	750pb	270pb			
EC_65	A	HI2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_101	A	HI2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_38	B	HI2 FIIBA I1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
EC_33	B	HI2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_47	C	HI2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_49	D	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EC_103	E	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EC_27	F	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EC_102	F	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EC_53	G	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EC_56	G	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EC_4	H	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_39	H	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_78	I	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_24	J	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EC_67	K	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EC_59	L	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_44	M	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_18	N	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_62	O	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC_60	P	HI2 FI	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para conocer la localización del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> se realizó la técnica de *southern blot* en algunas cepas representativas y nos proporcionó los siguientes resultados (Figura-25):

- La digestión con S1 nucleasa y posterior hibridación con la sonda VIM-1 fue positiva en todas las cepas salvo en la cepa EC-78 que no mostró bandas ni en la digestión ni en la hibridación y que previamente había sido positiva por PCR (Figura-25 panel A y B).
- La sonda IncHI2 hibridó con las bandas que previamente habían hibridado con la sonda VIM-1 (Figura-25 panel C).
- Para comparar los resultados se utilizaron dos cepas control, una perteneciente a un aislamiento de *E. cloacae* productor de VIM-1 localizado en un plásmido tipo IncHI2 y otra cepa de *K. pneumoniae* productora de VIM-1 que se localizó en un plásmido del grupo IncI1 y que fueron cedidas por el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal (55).

Los experimentos de digestión con S1 nucleasa e hibridación con las sondas VIM-1 e IncHI2 confirmaron que el gen *bla*<sub>VIM-1</sub> estaba localizado en un plásmido del grupo de incompatibilidad IncHI2.



**Figura-25.** Gel de electroforesis e hibridación de las cepas de *E. cloacae* productoras de VIM-1.

A) Digestión del ADN con *S1* nucleasa, B) Hibridación con la sonda VIM-1, C) Hibridación con la sonda IncHI2.

Finalmente, el gen *bla*<sub>VIM-1</sub> fue transferido por conjugación bacteriana en el 41,2% (7/17) de los aislamientos de *E. cloacae*. La resistencia a  $\beta$ -lactámicos fue confirmada mediante la realización de PCR que fue positiva en todos los transconjugantes obtenidos (Tabla 13).

## 2.8 Secuenciación de genoma completo de la cepa EC\_38.

### 2.8.1 Descripción de la cepa.

Para profundizar en los hallazgos descritos anteriormente, se decidió secuenciar el genoma completo de un aislamiento de *E. cloacae* productor de carbapenemasa VIM-1. Para ello, se seleccionó una cepa, denominada EC\_38VIM, que fue aislada de un hemocultivo de un paciente que falleció a causa de una sepsis secundaria a una colangitis por *E. cloacae* resistente a carbapenémicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y sulfonamidas, manteniendo sensibilidad a ampicilina. Se obtuvo un total de 338.715 lecturas “single-end” (165.540.445 pb). El ensamblado del genoma dio lugar a 90 *contigs* y una longitud total del genoma de 5.155.870 pb (5Mb). La secuencia del genoma fue depositada en la base de datos de GenBank y se le asignó el número de acceso [ATHX00000000](#), *BioProject* [PRNA203245](#) y *BioSample* [SAMN02194084](#).

### 2.8.2 Identificación de la especie bacteriana.

La cepa EC\_38VIM fue identificada inicialmente como *E. cloacae* mediante pruebas bioquímicas. La secuenciación del genoma confirmó que se trataba de una nueva especie dentro uno de los clados de *E. cloacae* complex, denominada *Enterobacter roggenkampii*.

### 2.8.3 Anotación del genoma.

El genoma fue anotado con la herramienta PGAAP a través de NCBI proporcionando un total de 4.999 genes, de los cuales, 4.864 fueron secuencias de DNA codificante (CDS), 56 pseudogenes, 4 ARNr (5S, 16S y 23S) y 75 genes que codificaban ARNt.

### 2.8.4 Tipificación molecular.

La tipificación molecular fue realizada mediante la comparación de las secuencias con la base de datos PubMLST de *E. cloacae* y dio como resultado un perfil alélico compatible con el ST96 (Tabla 15).

Tabla 15. Perfil alélico por MLST de la cepa EC\_38VIM.

Genes	Secuencia	Alelos
<i>gyrB</i>	TGAAGTGGCGCTGCAGTGGAACGACGGTTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTTACCAACAAC ATTCCACAGCGTGACGGTGGTACCCACCTTGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCCGTACC CTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAGAAAGCGAAAGTCAGCGCCACCGGT GACGATGCCCGTGAAGGCCTGATTGCCGTGGTTTCCGTGAAGGTGCCGGATCCGAAGTTCT CCTCACAGACCAAGACAAGCTGGTCTCTCCGAGGTGAAATCGGCGGTTGAGCAGCAGAT GAACGAAGTCTGAGCGAATACCTGCTGGAACACCGTCCGACGCGAAAAATCGTGGTGGG CAAAATTATTGATGCGGCGCGTGCCCGTGAAAGCGGCGGTAAAGCCCGTGAAATGACCCGT CGCAAAGGCG	49
<i>pyrG</i>	GCGGCCGCTTTTATTGCCGCGCTACGCCGTGAGAACGGCATCCCGTTCTGGGCACC TGCGGCGGGTTCCAGCATGCGCTGATTGAGTATGCCCGAAACGTGCTGGGCTGGGCTGAT GCGGCACACGCTGAGACGGATACCGAAGGCACCATGGTATTGCGCCGTGACCTGCTCG CTGGTGGAAAAACGGATGCCATTGAGCTGCGCAATAATACGCTGATCGCCAAAGCGTACG GCAAGCCCGAAATTGAAG	49
<i>fusA</i>	TGGACCGTATGGGTGCTAACTCCTGAAAGTTGTTGGCCAGATCAAAACCCGTCTGGGCGC GAACCCGTGTTCCGCTGCAGCTGGCAATTGCTGCTGAAGAAAGGCTTACCGGCGTTATCGAC CTGGTGAAGTGAAGCCATCAACTGGAACGATGCAGACAGGCGTTACCTTCGAATACG AAGATATCCAGCTGCAATGCAGGACCTGGCTGACGAATGGCACCAGAACCTGATCGAATC CGCTGCTGAAGCTTCTGAAGAGCTGATGGAGAATACCTGGGTGGTGAAGAACTGACTGAA GAAGAGATCAAAAAAGCTCTGCGTCAGCGCGTTCTGAACAACGAAATCATCTGGTAACCTG TGGTCTCGGTTCAAGAACAAAGGTGTTGAGGCGATGCTGGATGCGGTAGTTGACTACCTG CGATCCCGAGTTGACGTTCTGCGATCAACGGCATCTGGACGACGGTAAAGATACCCCGG CTGAGCGTCACGCAAGCGACGAAGAGCCATTCTCTGCACTGGCGTTCAAAATTGCTACCGA CCCATTCGTGGGTAACTGACCTTCTCCGCGTTTACTCTGGTGTGTTAACTCCGGTGACA CCATCTGAACCTCCGTGAAAGCGGCGCGTGAGCG	39
<i>leuS</i>	TCAGCCCGCGCTGCGCGAAACCGACACCTTTGACACCTTTTGGAGTCATCCTGTTACTAT GCTCGCTACACCTGTCCGAGTATCAGGACGGCATGCTGGATTCCAAAGCAGCGAACTACT GGCTGCGCGTAGATATCTACATCGGTGGTATCGAACACGCCATCATGCACCTGCTCTACTTC CGCTTCTTCCACAAGCTGATGCGCGATGCGGGCATGGTGAACCTGACGAACCTGCAAAAC AGCTGCTGTGCCAGGGCATGGTGTGCGGATGCCCTTATTACGTCGGGGCGAACCGGG AGCGTAACCTGGGTATCTCCGTTGACGCGATCGTTGAGCGCGACGAGAAGGGCCGTATCG TGAAGGCGAAAGACGCTGAAGGTCACGAGCTGGTCTACACCGGCATGAGCAAAATGTCCAA GTCGAAAAACAACGGTATCGACCCGACGGTGATGGTTGAGCGTTATGGTGGGATACCGTG CGTCTGTTGATGATGTTTGCCTCTCCGCGACATGACGCTGGAATGGCAGGAGTCTGGCG TGGAAGGCGCAACCGCTTCTGAAACGCG	57
<i>dnaA</i>	CGCGCTGCTGATCGATGACATTCACTTTTGGCAACAAGAACGATCGCAGGAAGAATTTT TCCACACCTTCAACGCCCTTCTGGAAGGCAATCAGCAGATCATTTTACCTCGGATCGTTAT CCAAAAGAGATCAACGGTGTGGAAGATCGTCTGAAATCCCGCTTCCGCTGGGGCTGACCG TGGCGATCGAGCCACCGGAGCTGGAACCCGCGTCCGATCCTGATGAAGAAAGCCGATG AAAACGACATTGCGCTGCCGGGTGAAGTGGCGTTCTTATTGCCAAGCGTCTGCGCTCCAA CGTGCCTGAGCTCGAAGGGGCACTGAACCGGTTATCGCCAATGCCAACTTTACCGGTCTG GCAATCACCATCGATTTTGTGCGTGAAGCGCTGCGTGATTGCTGGCATTGCAGGAAAAAT GGTCACTATCGAC	57
<i>rpB</i>	TTTTGCTCCGTTGCTGAAAAAACAGCAATCCGGTGGTGTGTAACAACAATGGCCGTATCA CCACTCGTCACATCGGTGGTGGCCACAAGCAGGCTTATCGTATTGTTGACTTCAAACGCAAC AAAGACGGTATCCAGCAGTTGTTGAACGCTTGTAGTACGATCCGAACCGTTCCGCGAACA TCGCGCTGGTTCTGTACAAAGACGGCGAACGCCGTTACATCCTGGCCCTAAAGGCCGTGA AGCTGGCGACCAAGTTCAGTCTGGCGTTGATGCTGCAATCAAAGCAGGCAACACCTGCCG ATGCGCAATATCCCGGTTGGTTCTACCGTTTCAACGTAGAAATGAAACAGGTAAAGGCGG TCAGCTGGCGGCTTCCGCGGCTACTTACGTTGATGATCGTTGCGCGTATGGTGCTTATGTC ACCCTGCGTCTGCGTTCTGGTGAATGCGTAAAGTCAAGCAGACTGCCGCGTACTCTGG GCGAAGTTGGCAATGCTGAGCATATGCTGCGCGTTCTGGGTAAAGCAGGTGCTGCACGCTG GCGTGGTGTTCTGCTACCGTTCCGCGTACTGCGATGAACCCAGTCGACCAACCA	12
<i>rpoB</i>	ACATTAAAGAACAAAGTCTACATGGGTGAAATCCACTCATGACAGACAACGGTACTTTT GTTATTACGGTACTGAGCGTGTATCGTTTCCAGCTGCATCGTAGCCCGGGCGTCTTCTT CGACAGCGATAAAGGTAAACGCACTTCCGGAAGTACTGTATAACGACGATCATTC CTTACCGTGGTCTCGGCTGGACTTCGAGTTCGATCCAAAGACAACCTGTTTGCCTATC GACCGTCTGCTGTAACCTGCTGCAACCATCATTTCTGCGTGCATGAACTATACCACTGAGCA GATCCTGGACCTGTTCTTTGAGAAAGTATCTTGAATCCGCGACAAACAAGCTGCAGATGG AGCTGGTGGCGAACGCTGCGTGGTGAAGCGGCTGCTGACATCGAAGCCGACGGCA AAGTGATGTGAAAAAGGTGCGCGTATCACCGCGGCCACATCCGCCAGCTGGAAAAAGA TGATATCAACACATCGAAGTTCCGGTTGAATACATTGACGAAAAAGTAGGC	20

### 2.8.5 Resistoma y Moviloma.

El análisis de los genes de resistencia confirmó la presencia de 14 genes asociados a diferentes familias de antimicrobianos, de entre ellos, se identificó la MBL VIM-1 responsable de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos. Además, se pudo comprobar que el gen *bla*<sub>VIM-1</sub> se asoció a un integrón de clase 1 y que presentó la estructura descrita en el apartado 2.6 (Figura-22). El análisis de replicones identificó tres plásmidos dentro de los grupos de incompatibilidad IncHI2, IncF e IncI1. Estos hallazgos coincidieron con los experimentos de tipificación plasmídica descritos en los apartados anteriores y que están recogidos en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Características fenotípicas y genotípicas de la cepa EC\_38VIM.

Identificación taxonómica	
Pruebas Bioquímicas	Secuenciación Genoma Completo
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter roggenkampii</i>
Tipificación molecular	
PFGE	MLST
Clon B	ST96
Resistencia a los antibióticos	
Fenotipo	Genotipo
<b>Resistencia a <math>\beta</math>-lactámicos</b>	
Imipenem CMI > 32mg/L	<i>bla</i> <sub>MIR-8</sub>
Meropenem CMI > 32mg/L	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>
Ertapenem CMI > 32mg/L	
<b>Resistencia a aminoglucósidos</b>	
Gentamicina CMI > 8mg/L	<i>aadA1</i>
Tobramicina CMI > 8mg/L	<i>aacA4</i>
	<i>aph(3')-Ia</i>
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
<b>Resistencia a Quinolonas</b>	
Ciprofloxacino CMI > 2mg/L	<i>qnrA1</i>
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
<b>Resistencia a Fenicoles</b>	
Cloranfenicol	<i>catA1</i>
	<i>catB2</i>
Resistencia a sulfonamidas**	<i>sul1</i>
Resistencia a Trimetoprim**	<i>dhfrB1</i>
Elementos de transferencia horizontal	
Tipo de Integrón	Tipo de plásmidos
In624	IncHI2
	IncFIncI1

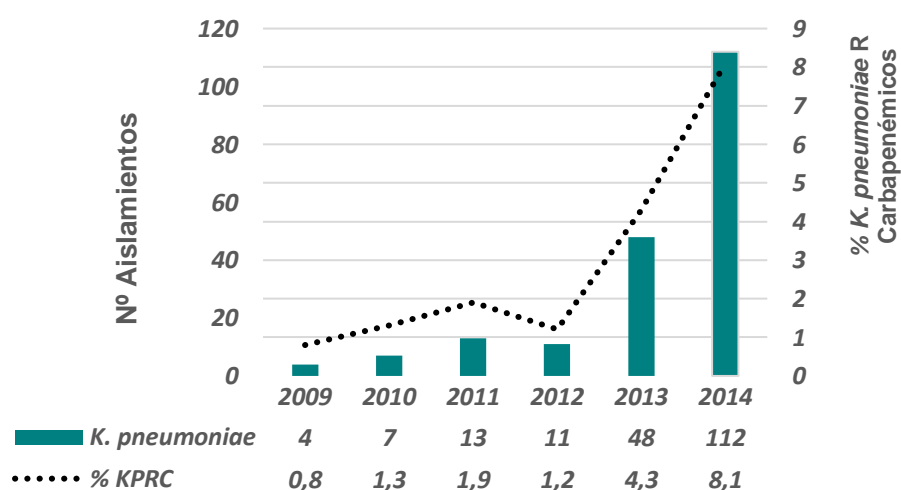
\*\*Trimetoprim/sulfametoxazol [SXT] (CMI > 4/78mg/L)



### 3. Estudio epidemiológico y molecular de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa durante 2009-2014.

#### 3.1 Características generales.

En junio de 2009, se detectó el primer aislamiento de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa en el Hospital Universitario 12 de Octubre. Desde ese momento, se observó un desplazamiento de *E. cloacae* a favor de *K. pneumoniae* que se instauró como la especie de EPC más frecuentemente aislada en el hospital. Se realizó un estudio retrospectivo durante los años 2009 a 2014 para analizar las características clínicas y moleculares de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos. Se identificaron 5.101 aislamientos de *K. pneumoniae*, de los cuales, 195 tenían sensibilidad disminuida a carbapenémicos. De éstos se seleccionaron 97 cepas que estaban disponibles en el cepario de Microbiología, el resto de las cepas (98 cepas) no pudieron ser recuperadas (Figura-26).

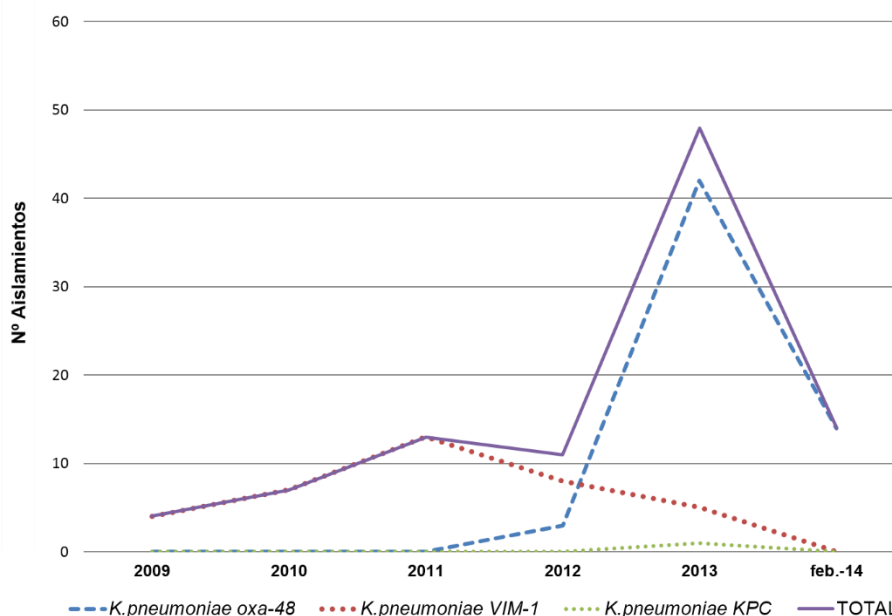


**Figura-26.** Distribución temporal de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (KPRC) durante el periodo de estudio.

Las 97 cepas fueron aisladas de diferentes tipos de muestras, de las cuales 37 fueron orinas, 17 exudados de herida quirúrgica, 10 muestras de hemocultivos, 3 de exudados de herida no quirúrgica, 4 muestras respiratorias, 2 catéteres vasculares y 24 torundas rectales.

### 3.2 Detección de carbapenemasas.

Se confirmó la presencia del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> en 59 aislamientos, del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> en 37 aislamientos y del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en 1 aislamiento. No se detectó co-producción de carbapenemasas en un mismo aislamiento. Sin embargo, se detectó la presencia de la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido de tipo CTX-M-15 en todas las cepas productoras de carbapenemasas estudiadas. En la Figura-27 se muestra la distribución temporal de los aislamientos de *K. pneumoniae* en función del tipo de carbapenemasa.



**Figura-27.** Distribución temporal de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas.

### 3.3 Perfil de resistencia de los aislamientos de *K. pneumoniae* multirresistente.

Todos los aislamientos de *K. pneumoniae* que se incluyeron en este estudio mostraron resistencia a  $\beta$ -lactámicos y a la combinación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam). De los carbapenémicos, el meropenem fue el que mayor actividad mostró con un porcentaje de resistencia del 14,9%, seguido de imipenem con 21% de resistencia. Doripenem fue el carbapenémico con actividad más baja con un 60,6% de resistencia en las *K. pneumoniae* VIM-1 y el 100% de resistencia en el caso de los aislamientos de *K. pneumoniae* OXA-48. Tras analizar el perfil de resistencia de los aislamientos, pudimos comprobar que la proporción de aislamientos resistentes a ertapenem fue muy diferente si se comparaba los grupos de aislamientos productores de carbapenemasa OXA-48 vs. VIM-1 (8,6% y 91,5%, respectivamente). En la Tabla 17 se muestran los perfiles de resistencia a los antibióticos, tanto de la familia de los  $\beta$ -lactámicos, como de otras familias (aminoglucósidos, quinolonas, sulfonamidas) y los rangos de CMI<sub>s</sub> que presentan para cada antibiótico.

**Tabla 17.** Perfil de resistencia de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas.

Antibiótico	Aislamientos Totales (n=97)	Aislamientos VIM-1 (n=37)	Aislamientos OXA-48 (n=59)
	CMI (mg/L) / (%R) <sup>b</sup>	CMI (mg/L) / (%R) <sup>b</sup>	CMI (mg/L) / (%R) <sup>b</sup>
IPM <sup>a</sup>	0,19 a >32 (21,0)	0,19 a >32 (17,1)	0,5 a >32 (22,0)
ETP <sup>a</sup>	0,008 a >32 (61,0)	0,008 a >32 (8,6)	0,75 a >32 (91,5)
MEM <sup>a</sup>	0,19 a >32 (14,9)	0,19 a >32 (2,9)	0,25 a >32 (20,3)
DOR <sup>a</sup>	0,094 a >32 (86,0)	0,094 a >32 (60,6)	2 a >32 (100)
GEN	≤2 a >8 (48,4)	≤2 a >8 (42,9)	≤2 a >8 (52,5)
TOB	≤2 a >8 (78,1)	≤4 a >8 (65,4)	≤2 a >8 (89,2)
AMK	≤2 a >16 (4,2)	≤2 a >16 (8,6)	≤2 a >16 (1,7)
CIP	≤0,5 a >2 (82,8)	≤0,5 a >2 (61,5)	>2 (100)
SXT	<2/38 a ≥4/76 (93,8)	<2/38 a ≥4/76 (96,3)	<2/38 a ≥4/76 (96,8)
FOS	≤16 a 64 (59,6)	≤16 a 64 (29,4)	≤16 a 64 (78,0)

<sup>a</sup> CMI determinada por E-test; <sup>b</sup> Interpretado según EUCAST

### 3.4 Características clínicas de los pacientes.

De los pacientes colonizados/infectados por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPPC), 88 fueron pacientes adultos y 9 fueron pacientes pediátricos. Los pacientes adultos se caracterizaron por tener una mediana de edad de 68 años, el 47,7% fueron varones y el 95% habían recibido tratamiento antibiótico en los 3 meses previos al ingreso (Tabla 18). De los 88 pacientes adultos, 67 casos se consideraron infecciones por KPPC y 21 colonizaciones (17 cultivos de vigilancia mediante exudado rectal, 3 muestras de orina y 1 cultivo de esputo).

Las características clínicas de los pacientes adultos infectados/colonizados por KPPC se presentan en la Tabla 18. La comparación de estas características entre los pacientes colonizados/infectados por *K. pneumoniae* OXA-48 vs. VIM-1 mostró que los pacientes con OXA-48 eran más frecuentemente varones (53,5% vs. 34,5%;  $p=0,097$ ) y provenían más frecuentemente de centros sociosanitarios (17,2% vs. 3,5%;  $p=0,069$ ), aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Por otro lado, los pacientes colonizados/infectados por *K. pneumoniae* VIM-1 ingresaron más frecuentemente en el Servicio de Nefrología (44,8% vs. 1,8%;  $p < 0,001$ ), eran más frecuentemente receptores de trasplante de órgano sólido (63,9% vs. 36,4%;  $p < 0,001$ ) y presentaban con mayor frecuencia infecciones del tracto urinario (51,7% vs. 31,0%;  $p=0,062$ ) (Tabla 18).

Por otro lado, de los 9 pacientes pediátricos que fueron colonizados/infectados por KPPC, 6 pacientes fueron neonatos e ingresaron en la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología (UCIN), y 3 pacientes de edades comprendidas entre 1-2 años ingresaron en la planta de pediatría. De los 9 aislamientos de KPPC que afectaron a los pacientes pediátricos, 7 (78%) fueron obtenidos a partir de muestras de colonización procedentes de los neonatos y de uno de los pacientes pediátricos y las otras dos 2 muestras fueron infecciones (1 muestra de orina y 1 muestra de exudado de herida quirúrgica) que se obtuvieron de los otros dos pacientes pediátricos. Los 9 pacientes habían recibido tratamiento antibiótico previo a la infección/colonización por KPPC.

**Tabla 18.** Características clínicas de los pacientes adultos infectados/colonizados por *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas.

Características	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 y VIM-1				<i>K. pneumoniae</i> OXA-48		
	Total (n=87)	OXA-48 (n=58)	VIM-1 (n=29)	<i>p</i>	ST11 (n=44)	Otros STs (n=14)	<i>p</i>
Mediana de Edad (rango en días)	68 (19-101)	69 (26-101)	68 (19-82)	0,103	65 (32-98)	76 (21-95)	0,030
Sexo Masculino	41 (47,7)	31 (53,4)	10 (34,5)	0,097	25 (56,8)	6 (42,9)	0,366
<b>Servicio Diagnóstico</b>							
UCIs	14 (15,9)	10 (17,2)	4 (13,8)	0,682	9 (20,5)	1 (7,1)	0,255
Nefrología	14 (15,9)	1 (1,7)	13 (44,8)	<b>&lt;0,001</b>	0	1 (7,1)	-
Hematología	11 (12,5)	9 (15,5)	2 (6,9)	0,257	9 (20,5)	0	-
Medicina Interna	7 (8,0)	5 (8,6)	2 (6,9)	0,782	3 (6,8)	2 (14,3)	0,390
Unidades quirúrgicas	15 (17,0)	15 (25,9)	0	--	12 (27,3)	3 (21,4)	0,666
Urgencias	15 (17,0)	11 (19,0)	4 (13,8)	0,549	5 (11,4)	6 (42,9)	0,009
Otros	11 (13,6)	7(12,1)	4 (13,8)	0,821	6 (13,6)	1 (7,1)	0,519
<b>Centros sociosanitarios</b>	11 (12,5)	10 (17,2)	1 (3,4)	0,069	8 (18,2)	2 (14,3)	0,739
<b>Hospitalización 3 meses previos</b>	70 (83,5)	45 (81,8)	25 (86,2)	0,610	32/41 (78,0)	13 (92,9)	0,219
<b>Factores de Riesgo</b>							
Tumor de órgano sólido	6 (6,8)	4 (6,9)	2 (6,9)	1,000	2 (4,5)	2 (14,3)	0,214
Tumor hematológico	11 (12,5)	9 (15,5)	2 (6,9)	0,257	9 (20,5)	0	-
Trasplante de órgano sólido	22 (25,0)	8 (13,8)	14 (48,3)	<b>&lt;0,001</b>	6 (13,6)	2 (14,3)	0,951
<i>Diabetes mellitus</i>	32 (36,4)	20 (34,5)	12 (48,3)	0,532	10 (22,7)	10 (71,4)	<b>&lt;0,001</b>

**Tabla 18.** Características clínicas de los pacientes adultos infectados/colonizados por *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas.  
(Continuación).

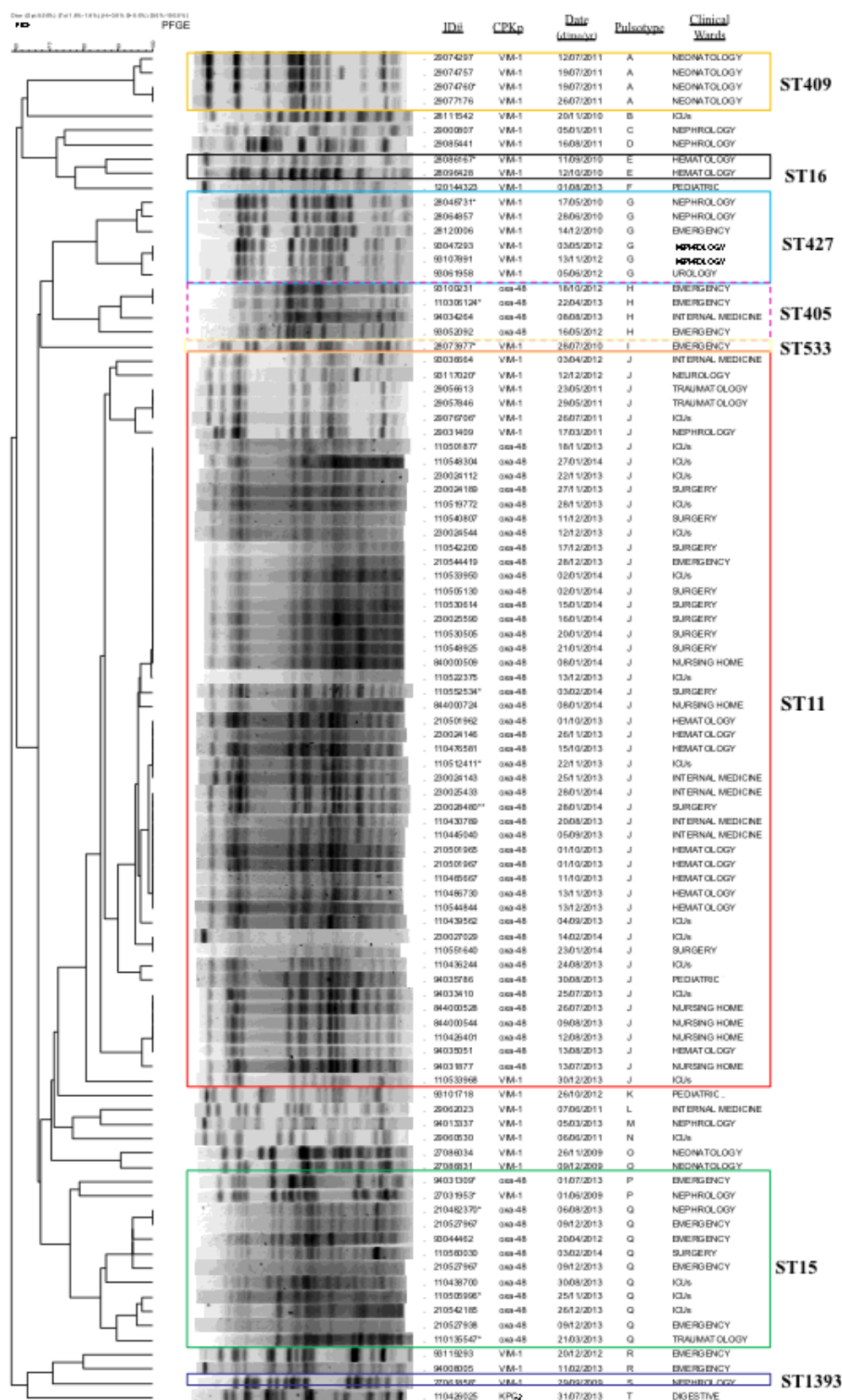
Características	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 y VIM-1				<i>K. pneumoniae</i> OXA-48		
	Total (n=88)	OXA-48 (n=58)	VIM-1 (n=29)	<i>p</i>	ST11 (n=44)	Otros STs (n=14)	<i>p</i>
<b>Procedimientos quirúrgicos</b>							
Sonda uretral	41 (46,6)	29 (50,0)	12 (41,4)	0,450	22 (50,0)	7 (50,0)	1
Catéter central	48 (54,5)	33 (56,9)	14 (48,3)	0,450	26 (59,1)	7 (50,0)	0,553
Cirugías	49 (55,7)	30 (51,7)	18 (62,1)	0,363	21 (47,7)	9 (64,3)	0,284
Tratamiento antibiótico previo (3m)	77 (87,5)	51 (87,9)	26 (89,7)	0,813	38/40 (95,0)	13 (92,9)	0,519
<b>Infecciones</b>							
Infección urinaria	33 (37,5)	18 (31,0)	15 (51,7)	0,062	13 (29,5)	5 (35,7)	0,666
Infección de herida	16 (18,2)	11 (19,0)	5 (17,2)	0,846	6 (13,6)	5 (35,7)	0,069
Infección respiratoria	3 (3,4)	2 (3,4)	1 (3,4)	1,000	2 (4,5)	0	-
Bacteriemia	10 (11,4)	7 (12,1)	2 (6,9)	0,458	6 (13,6)	1 (7,1)	0,519
Otros	5 (5,7)	3 (5,2)	2 (6,9)	0,746	3 (6,8)	0	-
<b>Colonizaciones</b>							
Estancia hospitalaria antes de KPPC (mediana [rango en días])	15,0 (0-30,0)	15,0 (1,0-29,5)	17,0 (2,0-46,0)	0,302	17 (3,0-30,0)	7,0 (0-25,0)	0,413
Estancia hospitalaria después de KPPC (mediana [rango en días])	15,0 (1,0-37,0)	14,5 (4,0-37,5)	21,0 (0-36,0)	0,846	15,0 (5,0-39,0)	10,0 (1,5-17,0)	0,639
Muerte durante hospitalización	24 (27,3)	19 (32,8)	5 (17,2)	0,118	15 (34,1)	4 (28,6)	0,666

### **3.5 Estudio de tipificación molecular.**

#### **3.5.1 PFGE.**

Para conocer la relación clonal que existió entre los aislamientos, se estudiaron 94 de 97 cepas de KPPC mediante PFGE. El análisis de los patrones electroforéticos dio lugar a 20 tipos de clones diferentes, de los cuales 9 clones agrupaban a 83 de los aislamientos (A = 4, E = 2, G = 6, H = 4, J = 51, O = 2, P = 2, Q = 10 y R = 2) y los 11 aislamientos restantes mostraron patrones de PFGE únicos (Figura-28). Los 59 aislamientos de *K. pneumoniae* productora de OXA-48 se encontraron agrupados bajo los clones (H, J, P, Q), siendo el clon J, “clon mayoritario”, el que agrupó a un mayor número de aislamientos (n= 44) y el responsable de la diseminación clonal en el hospital. Por otro lado, los 34 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de VIM-1 se agruparon en 17 patrones de PFGE mostrando una gran diversidad genética. Los clones J y P incluyeron tanto *K. pneumoniae* OXA-48, como *K. pneumoniae* VIM-1 (Figura-28).





**Figura-28.** Dendrograma basado en PFGE de los 94 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa.

### 3.5.2 MLST.

A partir de la relación clonal obtenida con el PFGE, se seleccionaron 11 aislamientos de KPPC que fueron representantes de cada clon (A, E, G, H, I, J, P, Q, R, S). El análisis por MLST agrupó a los aislamientos en 8 STs que se especifican en la Tabla 19:

**Tabla 19.** Relación del perfil alélico (MLST) y los patrones de PFGE en KPPC.

PFGE	MLST	Perfil alélico <i>K. pneumoniae</i>							Nº Aislados
		<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	
J	ST11	3	3	1	1	1	1	4	51
P/Q	ST15	1	1	1	1	1	1	1	12
E	ST16	2	1	2	1	4	4	4	2
H	ST405	2	1	62	3	10	4	110	4
A	ST409	5	1	11	1	7	11	24	4
G	ST427	2	4	1	1	7	1	46	6
I	ST533	16	24	48	51	65	32	131	1
S	ST1393	2	1	37	2	3	1	19	1

Los aislamientos de *K. pneumoniae* OXA-48 fueron agrupados en 3 STs (ST11, ST15 y ST405), mientras que los aislamientos de *K. pneumoniae* VIM-1 estuvieron incluidos dentro de 7 STs (ST11, ST15, ST16, ST409, ST427, ST533 y ST1393) dando lugar a una mayor diversidad clonal. Los aislamientos pertenecientes al “clon mayoritario”, J, fueron identificados como ST11 y los aislamientos correspondientes a los clones P y Q se identificaron como ST15 (Figura-28).

### 3.6 Descripción de los brotes clínicos intrahospitalarios.

La primera cepa de *K. pneumoniae* portadora de los genes *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>CTXM-15</sub>, perteneciente al complejo clonal ST11, fue aislada en marzo de 2011 de un paciente que ingresó en el servicio de Nefrología del H12O. Desde ese momento, se fueron detectando casos esporádicos de *K. pneumoniae* VIM-1 en diferentes servicios clínicos del hospital, hasta

que, en julio de 2013 apareció el primer aislamiento de *K. pneumoniae* OXA-48 perteneciente al complejo clonal de ST11.

La cepa *K. pneumoniae* OXA-48 ST11 fue aislada de una paciente de 80 años que fue trasladada a las urgencias del H12O procedente de un centro sociosanitario por deterioro del estado de salud. Como antecedentes, hay que destacar que había recibido tratamiento antimicrobiano en los últimos 3 meses y, como factor de riesgo, fue portadora de una sonda urinaria permanente. A su ingreso en el hospital, se recogió un urocultivo en el que creció una cepa de *K. pneumoniae* OXA-48 con un recuento mayor de 100.000 UFC/mL. La paciente permaneció ingresada en urgencias durante dos días con tratamiento antibiótico (ertapenem 1g cada 24 horas durante 7 días) y, posteriormente, fue dada de alta a su centro sociosanitario donde completó el tratamiento. Este primer aislamiento fue considerado como el caso índice ya que a partir de ese momento la cepa *K. pneumoniae* OXA-48 ST11 se diseminó por todo el hospital llegando a afectar a 44 pacientes que estuvieron ingresados en diferentes servicios clínicos del hospital. Es importante resaltar que 6 de estos pacientes procedían de centros sociosanitarios. La comparación de las características clínicas de los pacientes infectados/colonizados por *K. pneumoniae* OXA-48 pertenecientes al complejo clonal ST11 y *K. pneumoniae* OXA-48 pertenecientes a otros STs mostró que los pacientes con ST11 tenían una menor edad (mediana de edad 65,4 vs. 76,6;  $p = 0,030$ ), eran detectados menos frecuentemente en el servicio de urgencias (11,4% vs. 42,9%;  $p = 0,009$ ) y presentaban con menor frecuencia diabetes *mellitus* (22,7% vs. 71,4%;  $p < 0,001$ ) (Tabla 18).

La diseminación de la cepa de *K. pneumoniae* OXA-48 ST11 por todo el hospital fue la causante del brote más importante sucedido en el H12O durante el periodo de estudio, sin embargo, durante este tiempo también se produjeron otros brotes intrahospitalarios minoritarios en nuestra institución que afectaron a un menor número de pacientes, entre ellos, destacar el brote causado por los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de VIM-1 ocurrido en la UCIN que afectó a 6 neonatos. Los 6 aislamientos de KPPC se caracterizaron

por ser portadores del gen *bla<sub>VIM-1</sub>*, 4 de ellos presentaron el mismo patrón electroforético entre sí, fueron aislados en julio de 2011 y se denominaron como clon A (ST409). Los otros dos aislamientos, también idénticos, se identificaron como clon O y fueron aislados en un periodo de tiempo anterior (año 2009) (Figura-28).

### 3.7 Secuenciación del genoma completo de la cepa KP\_ST11\_OXA-48.

#### 3.7.1 Descripción de la cepa.

Se seleccionó una cepa de *K. pneumoniae* OXA-48 perteneciente al complejo clonal ST11 que fue representativa del brote originado en el H12O para realizar la SGC y estudiar en profundidad las características moleculares. La cepa denominada KP\_ST11\_OXA-48 fue aislada de un hemocultivo y se caracterizó por presentar un fenotipo resistente a todos los  $\beta$ -lactámicos, incluidos los carbapenémicos [CMI<sub>s</sub> > 32 mg/L], quinolonas, aminoglucósidos (excepto amicacina), sulfonamidas, macrólidos y tetraciclinas. Únicamente, se mantuvo sensible para fosfomicina.

La SGC requirió realizar dos carreras (plataforma Junior 454) para así obtener una profundidad de 31X. En la secuenciación se generaron un total de 400.168 lecturas “*single-end*” (185.726.039 pb). Con el ensamblado de novo, se obtuvieron 124 *contigs* con un N50 de 203.680 pb y una longitud total del genoma de 5.580.994 pb. La secuencia del genoma fue depositada en la base de datos de GenBank y se le asignó el número de acceso [JNHB000000000](#), *BioProject* [PRJNA249076](#), *BioSample* [SAMN02808712](#)).

### 3.7.2 Anotación del genoma.

El genoma fue anotado con PGAAP a través de NCBI proporcionando un total de 5.342 genes, de los cuales, 5.198 fueron CDS, 41 pseudogenes, 8 ARNr (5S, 16S y 23S) y 81 genes que codificaban ARNt y 14 secuencias de ARN no codificante (ARNnc).

### 3.7.3 Estudio del Resistoma.

En el genoma de KP\_ST11\_OXA-48 se confirmó la presencia de 121 genes adquiridos relacionados con la resistencia a antimicrobianos y antisépticos, biocidas y desinfectantes. De entre los genes que afectaron a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, destacar la detección de *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>CTXM-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>ACT</sub> y *bla*<sub>SHV-11</sub>. Además, se confirmó la presencia de varios genes asociados con la resistencia a otros antimicrobianos diferentes de  $\beta$ -lactámicos, así como, a metales y biocidas las cuales se describen en la Tablas 20 y 21.

**Tabla 20.** Genes de resistencia a metales y biocidas de la cepa KP\_ST11\_OXA-48.

Genotipo	
<b>Metales</b>	
Arsénico	<i>arsA, arsB, arsC, arsD, arsH, arsR</i>
Cobre	<i>copC, copD, copG, copR, copS, copZ, cutA, cutC, cutE, CRB, CSA</i>
Cobalto-Zinc-Cadmio	<i>czcD, czcR</i>
Cromo	<i>chrA, chrB, chrC, chrE, chrF, chl</i>
Mercurio	<i>merA, merB, merC, merD, merE, merP, merR, merT</i>
Zinc	<i>zraP, zraR, zraS</i>
<b>Biocidas</b>	
Clorhexidina	<i>oqxA, oqxB</i>
Dodecilsulfato sódico	<i>oqxA, oqxB</i>
Sales de benzalconio	<i>oqxA, oqxB</i>
Triclosán	<i>oqxA, oqxB</i>
Amonios cuaternarios	<i>qacA1</i>

Es importante destacar que esta cepa contiene en su genoma varios genes de resistencia a desinfectantes y biocidas, entre ellos, los genes *oqxA* y *oqxB* que afectan a clorhexidina.

**Tabla 21.** Características fenotípicas y genotípicas de la cepa KP\_ST11\_OXA-48.

Tipificación molecular	
PFGE	MLST
Clon J	ST11
Resistencia a los antibióticos	
Fenotipo	Genotipo
<b>Resistencia a <math>\beta</math>-lactámicos</b>	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>
Imipenem CMI > 32mg/L	<i>bla</i> <sub>ACT</sub>
Meropenem CMI > 32mg/L	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
Ertapenem CMI > 32mg/L	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
	<i>ompK35</i> *
	<i>ompK36</i> *
<b>Resistencia a aminoglucósidos</b>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
Gentamicina CMI > 8mg/L	<i>aac(3)-IIa</i>
Tobramicina CMI > 8mg/L	<i>aadA2</i>
	<i>aacA4</i>
	<i>aph(3')-Ia</i>
<b>Resistencia a Quinolonas</b>	<i>qnrB1</i>
Ciprofloxacino CMI > 2mg/L	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
<b>Resistencia a Fenicoles</b>	<i>catA1</i>
Cloranfenicol	<i>catB2</i>
<b>Resistencia a sulfonamidas**</b>	<i>sul1</i>
<b>Resistencia a Trimetoprim**</b>	<i>dhfrA12</i>
Elementos de transferencia horizontal	
Tipo de Integrón	Tipo de plásmidos
In27	IncFIB
	IncFII
	IncL/M
	IncR

\*Mutaciones que confieren resistencia a carbapenémicos; \*\*Trimetoprim/sulfametoxazol [SXT] (CMI > 4/78mg/L)

En este trabajo se analizaron las mutaciones cromosómicas que afectaron a la resistencia a los carbapenémicos y a las quinolonas. Las mutaciones en las secuencias de las porinas *ompK35* y *ompK36*, que se han relacionado con la resistencia a carbapenémicos, fueron estudiadas a partir de un alineamiento con los genes de referencia de las porinas *ompK35* y *ompK36* (166).

Los resultados del alineamiento del gen *ompK35* mostraron que la secuencia contenía una mutación puntual en posición 126 que implicó un cambio de aminoácido (T126S) y tres mutaciones silenciosas [G/A (L)], [C/T (Y)] y [C/T (H)], en la que hubo un cambio de nucleótido, pero que no implicó cambio de aminoácido (Figura-29).

En el alineamiento del gen *ompK36* se identificaron varias mutaciones puntuales, que no afectaron a la secuencia de aminoácidos, una inserción de 3 aminoácidos (L-S-P) en la posición 194 y 9 mutaciones importantes que dieron lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos (D48S, L58V, G191T, F200Y y S203\*). Las dos mutaciones producidas en la posición 203 dieron lugar a un codón de paro que provocó la interrupción prematura de la síntesis de la proteína (Figura-30).

Por otro lado, se detectaron 2 mutaciones cromosómicas en la región QRDR que afectaron al gen *gyrA* [S83F] y *parC* [S80I] y que se relacionaron con la resistencia a quinolonas.



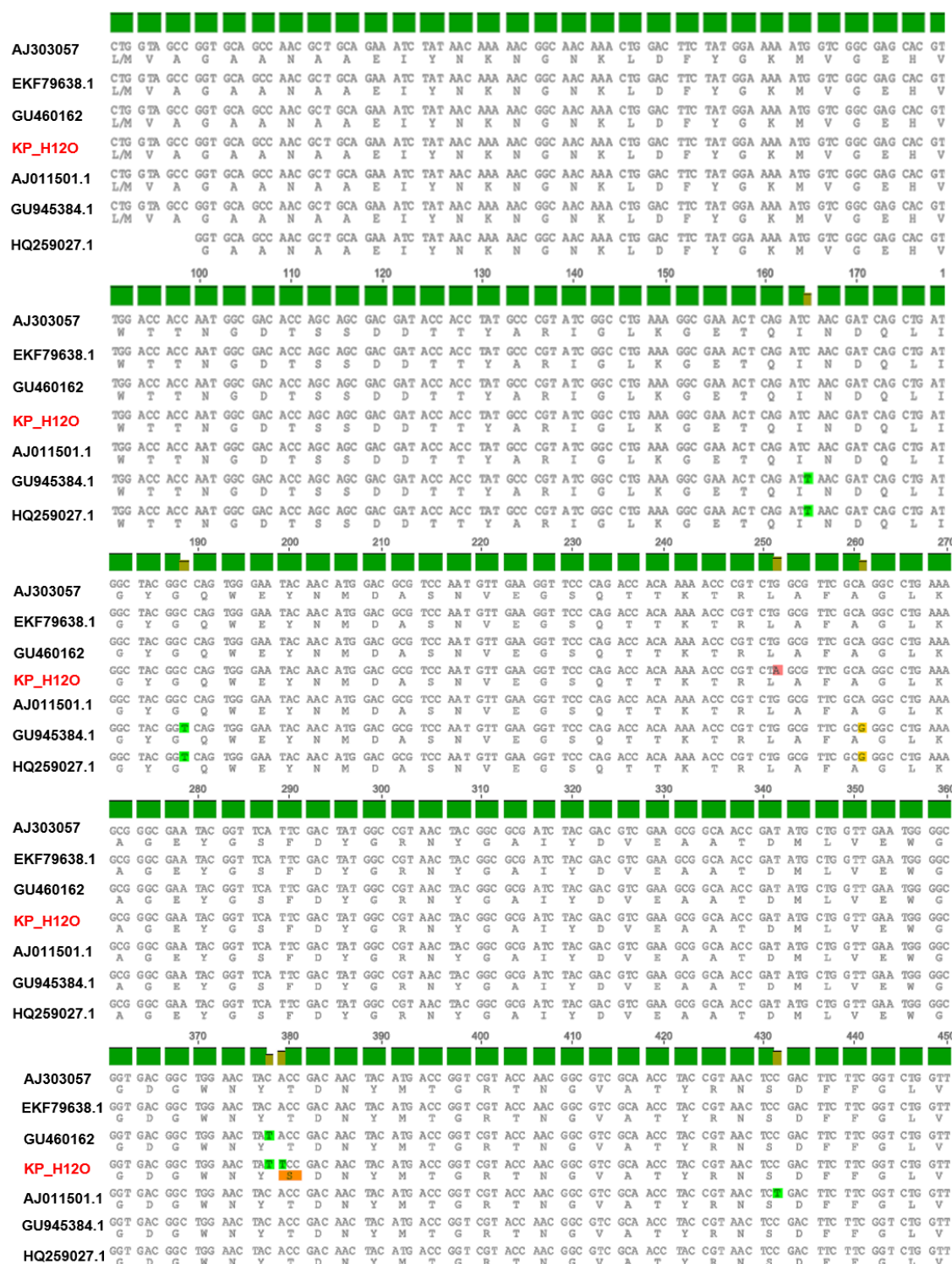
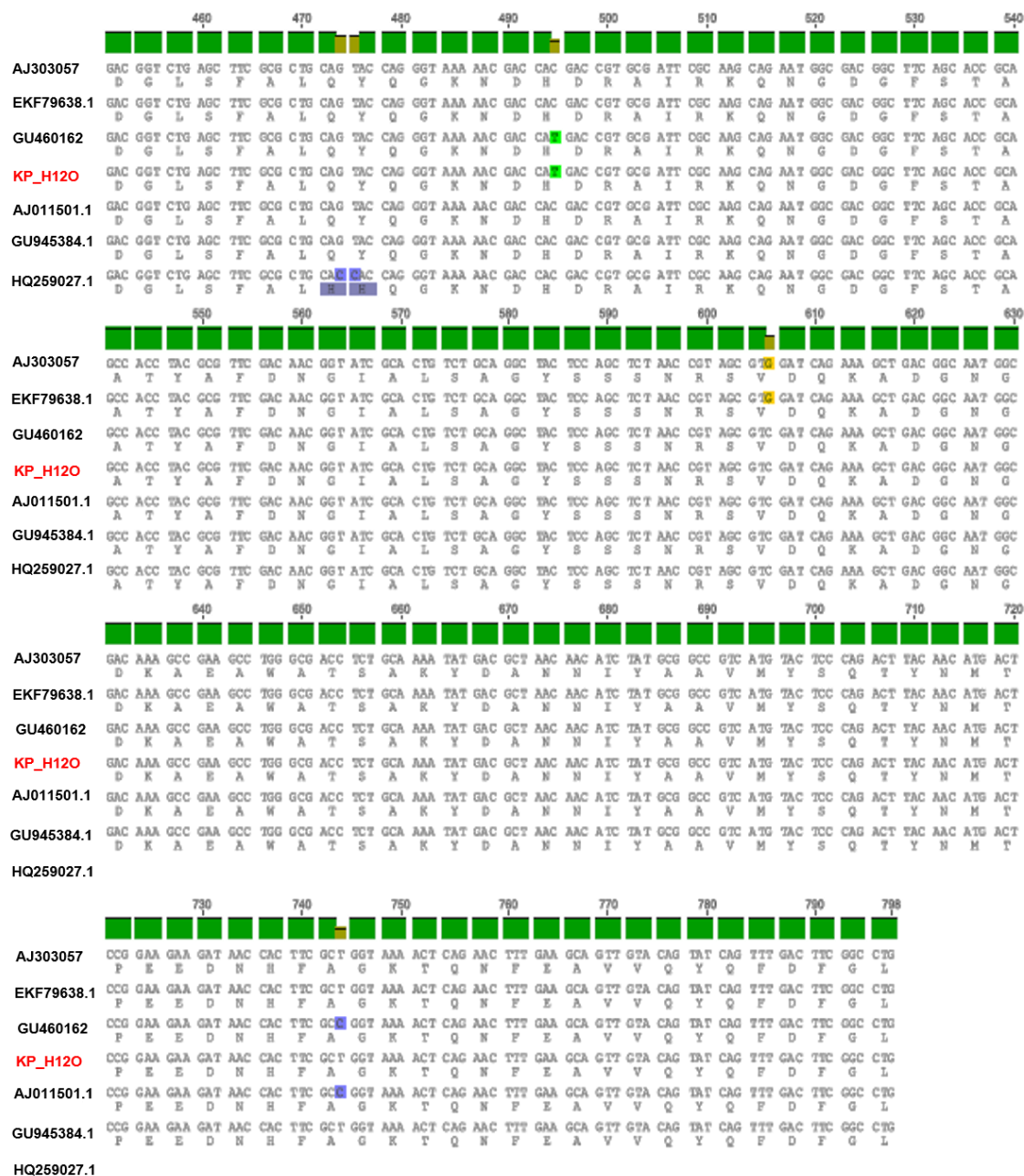
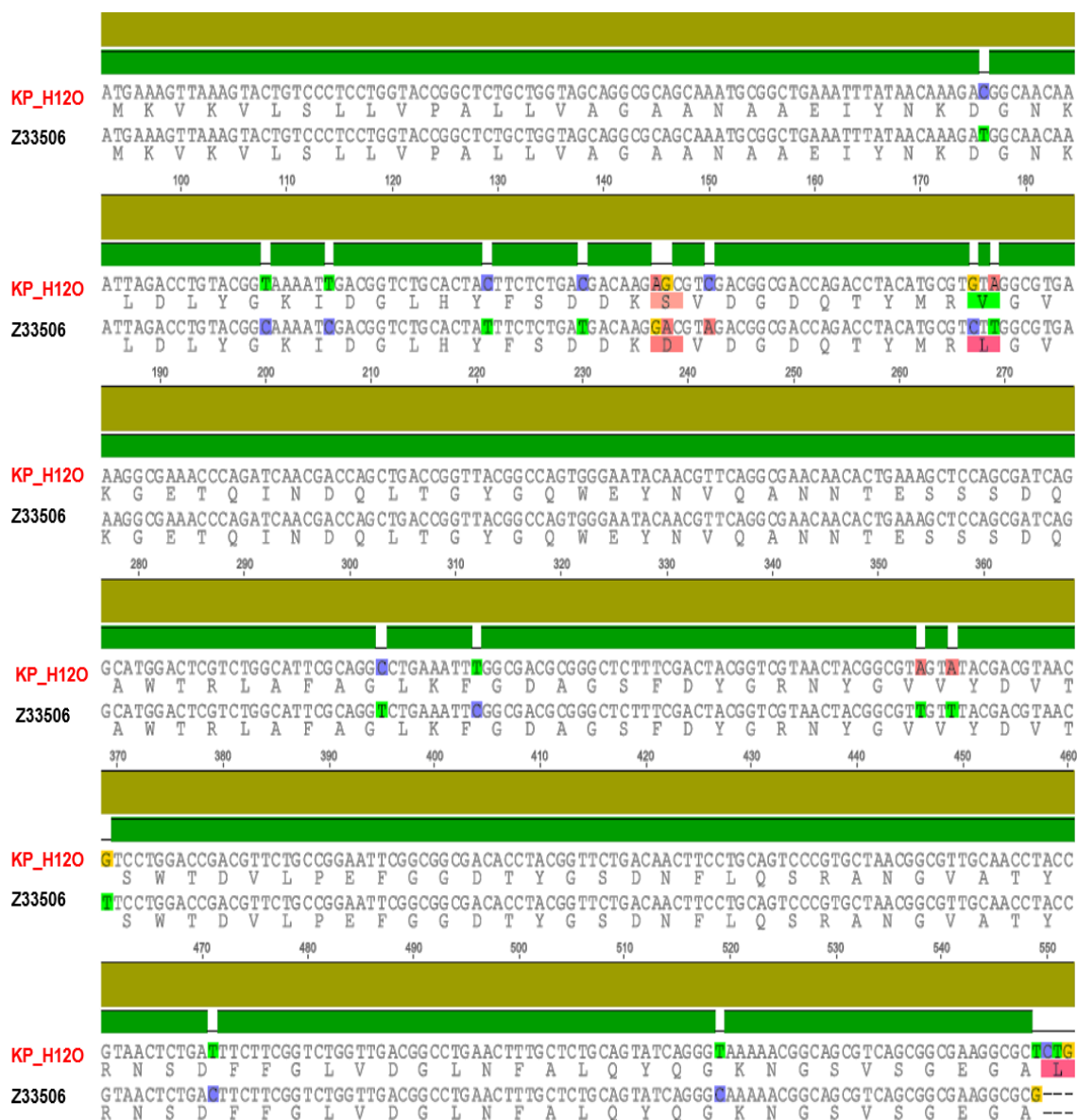


Figura-29. Alineamiento del gen *ompK35* de la cepa KP\_ST11\_OXA-48. Genes de referencia obtenidos de GenBank [AJ011501](#), [AJ303057](#), [GU945384](#), [HQ259027](#), [GU460162](#), [Z33506](#).

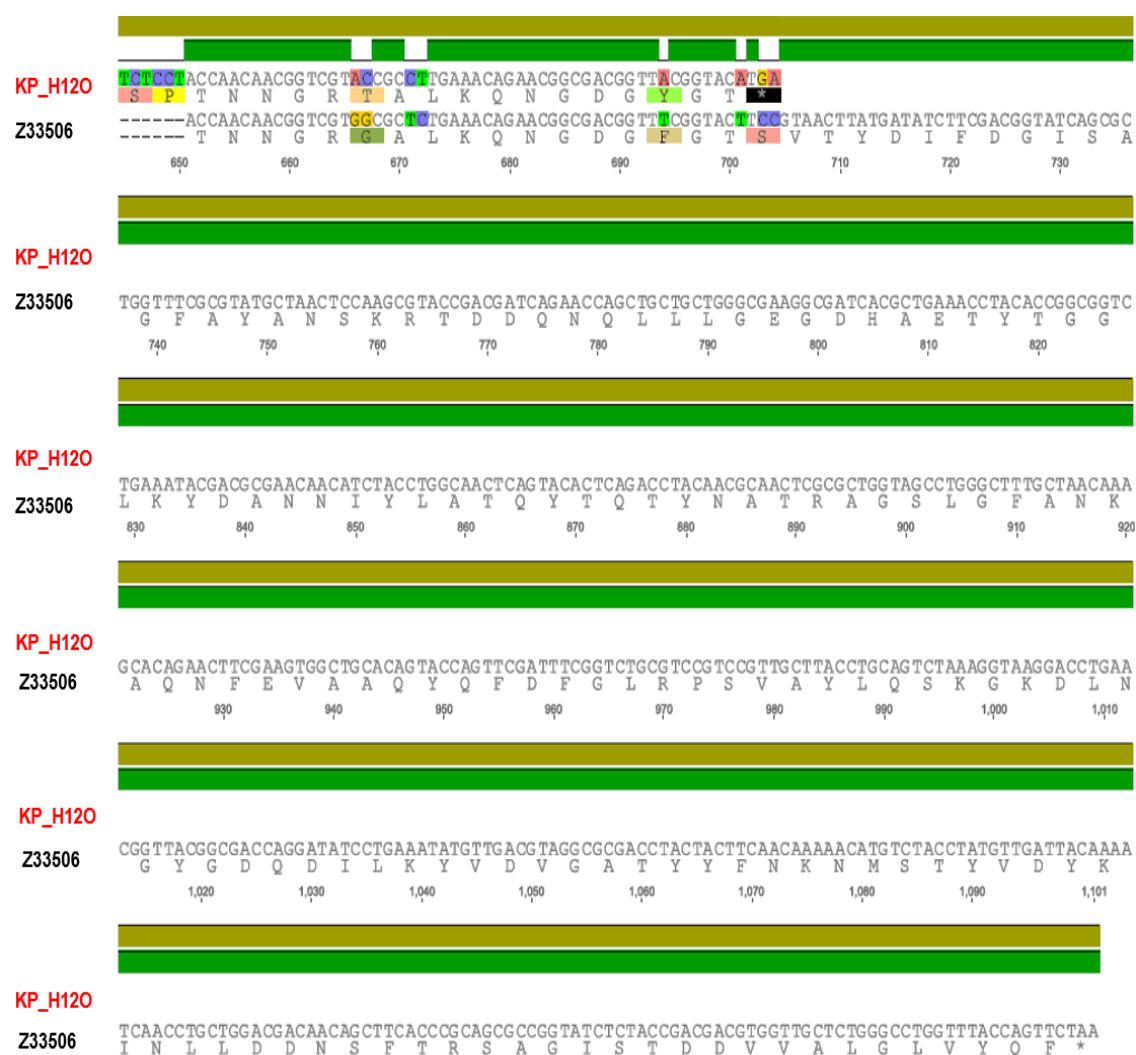


**Figura-29.** Alineamiento del gen *ompK35* de la cepa KP\_ST11\_OXA-48 (Continuación). Genes de referencia obtenidos de GenBank [AJ011501](#), [AJ303057](#), [GU945384](#), [HQ259027](#), [GU460162](#), [Z33506](#).



**Figura-30.** Alineamiento del gen *ompK36* de la cepa KP\_ST11\_OXA-48.

Genes de referencia obtenidos de GenBank [Z33506](#).



**Figura-30.** Alineamiento del gen *ompK36* de la cepa KP\_ST11\_OXA-48 (Continuación).

Genes de referencia obtenidos de GenBank [Z33506](#).

### 3.7.4 Estudio del Moviloma.

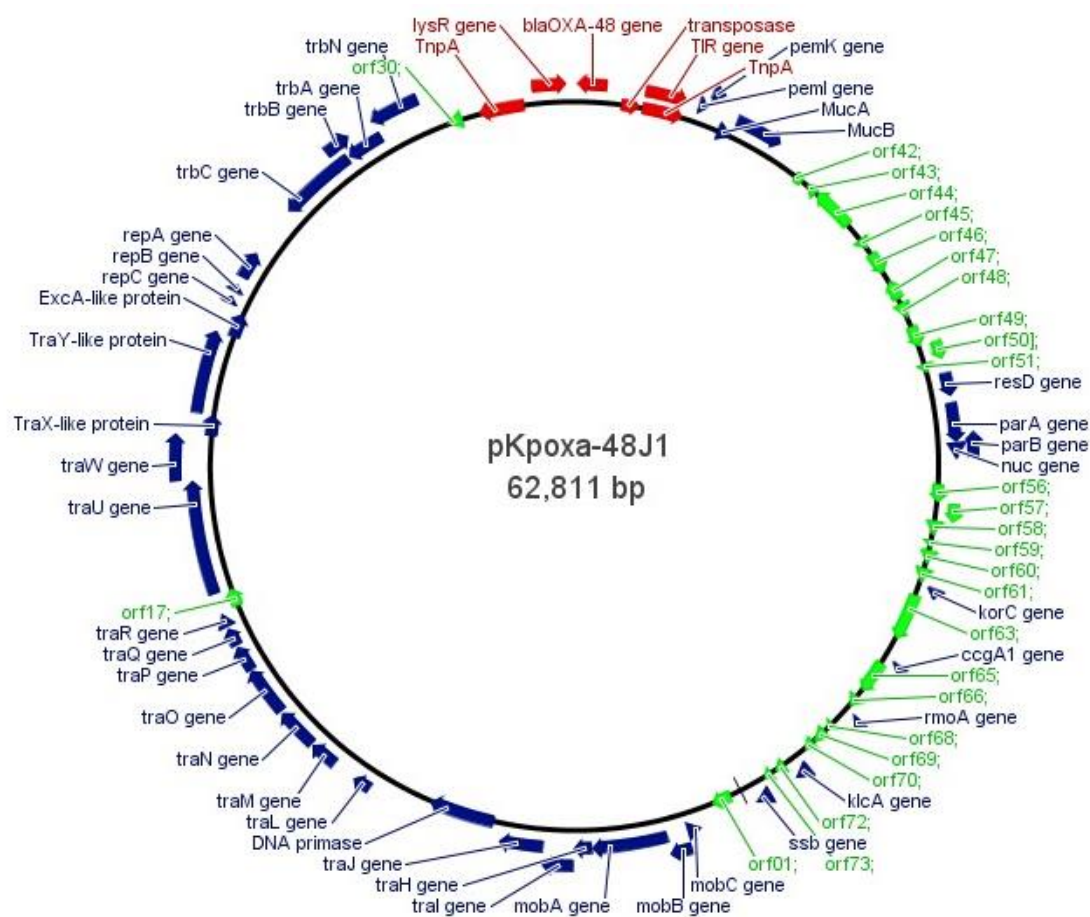
El análisis de los EGMs de transferencia horizontal identificó un integrón cuya estructura llevaba incluidos dos genes de resistencia [*intl-dhfrA12-aadA2-qacEΔ1/suI1*] y que se clasificó como *Int1* ([CP007729](#)). Además, se confirmó la presencia de 4 tipos de plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncFIB, IncFII, IncL/M e IncR. El gen *bla<sub>OX-48</sub>* se caracterizó por encontrarse asociado a un plásmido del grupo IncL/M, denominado pKPOXA-48J1 y que presentaba un tamaño de 62.811 pb (Figura-31). A su vez, el gen *bla<sub>OX-48</sub>* se encontró formando parte del transposón Tn1999.2 y dentro del gen *tir*, de manera que este gen permanecía truncado.

La secuencia del plásmido pKPOXA-48J1 mostró una identidad del 99-100% con las secuencias de otros plásmidos anteriormente descritos, pKPOXA-48N1 ([KC757416.2](#)), E71T ([KC335143.1](#)) y KP11978 ([JN626286.1](#)). La estructura del plásmido estaba formada por una región conservada, común a otros plásmidos, que incluía un módulo de replicación que se encarga de controlar el inicio de la replicación (genes *repA* y *repC*), genes de protección ultravioleta (*mucA* y *mucB*), genes que participan en el sistema de partición (*parA* y *parB*), factor de muerte (*pemI*), sistema de restricción (*ccgA1*) genes que participan en la transferencia y replicación (*korC*), genes de degradación del ADN (*nuc*), genes que participan en la estabilidad del plásmido (*resD*) y un módulo formado por 12 genes que participan en la conjugación (*tra*). La estructura del plásmido pKPOXA-48J1 se representa en la Figura-31.

### 3.7.5 Estudio del Viruloma

Se identificaron 4 determinantes de virulencia en el genoma de la cepa KP\_ST11\_OXA-48. El gen *ureA* que participa en el metabolismo de la urea y en la colonización gastrointestinal, el gen *uge* que contribuye a la expresión del lipopolisacárido en la superficie de la célula y que aporta la capacidad de producir infección urinaria y ser más virulento durante los cuadros de sepsis o neumonías, el gen *mrkD* que codifica la formación de fimbrias tipo 3, las cuales facilitan la adhesión a la membrana de los tejidos humanos, y el gen *prfB* que se encarga de regular la expresión de las fimbrias (167).





**Figura-31.** Estructura del plásmido pKPOXA-48J1.

Las flechas representan la dirección de la transcripción y los marcos de lectura. Los genes de resistencia adquiridos y los elementos móviles se representan de color rojo, la región conservada se representa de color azul y las proteínas que no tienen anotación se identifican con flechas de color verde.

### 4. Estudio molecular de los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasa durante 2009 – 2014.

#### 4.1 Características generales.

Durante el periodo 2009 a 2014, se obtuvieron 521 aislamientos de *C. freundii*, de los cuales 11 (2,1%) fueron resistentes a  $\beta$ -lactámicos y a la combinación con sus inhibidores, y mostraron sensibilidad disminuida a los carbapenémicos, según las recomendaciones de EUCAST versión 4.0, 2014. Las 11 cepas de *C. freundii* estuvieron disponibles para realizar la caracterización molecular mediante tecnología de secuenciación de alto rendimiento.

#### 4.2 Detección de carbapenemasas.

Todos los aislamientos de *C. freundii* que se seleccionaron por sospecha de producción de carbapenemasa se confirmaron mediante PCR en tiempo real, dando lugar a 10 aislamientos portadores del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> y 2 portadores de *bla*<sub>KPC-2</sub>. En una de las cepas (CF\_11) se detectó la presencia simultánea de VIM-1 y KPC-2 (Tabla 22).

#### 4.3 Perfil de resistencia de los aislamientos.

Los 11 aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasa se caracterizaron por presentar resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y a la combinación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas) a excepción de los carbapenémicos, que mostraron CMI en rango de sensibilidad para meropenem e imipenem en el 81,8% de los aislamientos. El perfil de sensibilidad para los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos fue variable con el 63,6% de los aislamientos sensibles a gentamicina, 27,3% a ácido nalidíxico, 45,4% a quinolonas y 9,1% a cotrimoxazol. Todas las cepas mostraron sensibilidad para tigeciclina y ampicilina (Tabla 22).



**Tabla 22.** Características microbiológicas y moleculares de los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas.

ID	Fecha	Servicio Diagnóstico	Tipo Infección/Colonización	Tipo Carbapenemasa	PFGE	MLST	CMI (mg/L)									
							IPM*	MEM*	ETP*	GEN	TOB	AMK	NAL	CIP*	SXT	TGC*
CF_1	20/08/2009	Neurología	ITU	KPC-2	A	ST89**	24	>32	>32	<2	>8	<4	>16	6	≤2/38	0,25
CF_4	02/09/2010	Nefrología	Herida	VIM-1	B	ST90**	2,0	0,75	0,75	>8	>8	<4	>16	4	>4/76	0,25
CF_6	19/06/2012	Medicina Interna	ITU	VIM-1	C	ST18	2,0	0,75	0,75	<2	>8	<4	>16	>32	>4/76	0,38
CF_7	02/10/2012	Nefrología	ITU	VIM-1	D	ST91**	2,0	0,75	0,75	<2	4,0	<4	<16	0,023	>4/76	0,50
CF_8	12/02/2013	Medicina Interna	ITU	VIM-1	E	ST22	2,0	0,75	0,75	>8	>8	<4	>16	>32	>4/76	0,75
CF_10	29/05/2013	UCI-P	Colonización	VIM-1	F	ST11	2,0	0,75	0,75	<2	8,0	<4	>16	0,38	>4/76	0,38
CF_11	08/06/2013	Cirugía	Respiratoria	VIM-1 / KPC-2	G	ST64	8,0	>32	>32	<2	4,0	<4	>16	0,19	>4/76	0,50
CF_12	01/07/2013	Traumatología	ITU	VIM-1	H	ST92**	2,0	0,75	2,0	>8	>8	<4	>16	>32	>4/76	0,125
CF_13	26/08/2013	Hematología	ITU	VIM-1	I	ST93**	2,0	0,75	0,75	<2	8,0	<4	<16	0,125	>4/76	0,125
CF_14	20/06/2014	Medicina Interna	ITU	VIM-1	C	ST18	2,0	0,75	0,75	<2	>8	<4	>16	>32	>4/76	0,38
CF_15	14/07/2014	Hematología	Colonización	VIM-1	J	ST94**	2,0	0,75	0,75	8,0	>8	<4	<16	0,006	>4/76	0,125

\*CMI determinada por Etest; \*\* Nuevo ST incluido en la base de datos MLST asignado en este estudio.

### 4.4 Características clínicas de los pacientes.

De los 11 pacientes infectados/colonizados por los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas, 8 fueron pacientes adultos y 3 fueron pacientes pediátricos. El rango de edad de los pacientes adultos con infección/colonización osciló entre 47 a 81 años, siendo la mediana de edad de 65,5 años y la mitad fueron varones. Los 3 pacientes pediátricos, 2 niños y una niña, presentaron edades de 5 meses (n=1) y 3 años (n=2). En relación con los tipos de infecciones que desarrollaron los pacientes, 7 fueron diagnosticadas como ITU, 1 infección del tracto respiratorio inferior y 1 infección de herida. Por otro lado, de los 3 pacientes pediátricos, 2 pacientes ingresaron en el servicio de Hematología y un paciente en la Unidad de Cuidados intensivos de pediatría (UCI-P). Dos de los niños se consideraron colonizaciones por aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasa y el otro se diagnosticó de una ITU.

### 4.5 Estudio de tipificación molecular por PFGE.

Las 11 cepas de *C. freundii* productoras de carbapenemasas se analizaron mediante PFGE para conocer la relación existente entre los aislamientos. Como resultados, se obtuvieron 10 patrones electroforéticos diferentes. Únicamente dos aislamientos (CF\_6 y CF\_14), que fueron denominados “clon C” estuvieron clonalmente relacionados y fueron aislados de dos pacientes adultos que habían estado ingresados en el servicio de Medicina Interna, pero en diferente periodo de tiempo (Tabla 22; Figura-32). Los aislamientos de los pacientes pediátricos mostraron diferentes patrones de PFGE (Figura-32).



**Figura-32.** Dendrograma basado en PFGE de los 11 aislamientos de CFPC.

## 4.6 Secuenciación de genomas completos.

### 4.6.1 Descripción de las cepas.

Los 11 genomas de *C. freundii* productores de carbapenemasas, que se seleccionaron por presentar sensibilidad disminuida a los carbapenémicos, fueron secuenciados mediante la plataforma MiSeq (Illumina), a partir de la preparación de librerías *paired-end* dando lugar a lecturas de 150 pb y un tamaño de inserto de 350 pb. El tamaño medio de los genomas fue de 5.364.016 pb con un contenido medio de G+C de 51,8%. El ensamblado de los genomas dio lugar a una media de 124 contigs y un tamaño N50 (87.280 – 426.377 pb). Todos los genomas fueron depositados en la base de datos GenBank asignándoles los números de acceso correspondientes. Los detalles de las métricas obtenidas en la secuenciación se muestran en la Tabla 23.

**Tabla 23.** Características de la secuenciación de los genomas de *C. freundii* productores de carbapenemasas.

ID.	Número Acceso	Lecturas Totales	Tamaño (pb)	Contigs (≥500 pb)	Contig Largo (pb)	N50 (pb)	GC (%)	Genes Total	CDS Total	Genes RNA
CF_1	<a href="#">MCJD00000000</a>	1.702.746	5.372.632	178	505.183	155.341	52,05	5.226	5.147	79
CF_4	<a href="#">MCOM00000000</a>	1.583.316	5.288.804	81	1.079.316	426.377	51,83	5.082	4.996	86
CF_6	<a href="#">MCON00000000</a>	1.625.756	5.394.131	126	530.789	375.062	51,59	5.327	5.231	96
CF_7	<a href="#">MCOO00000000</a>	1.682.216	5.279.224	133	596.601	199.021	51,88	5.128	5.037	91
CF_8	<a href="#">MCOP00000000</a>	1.669.822	5.418.698	151	440.943	127.768	51,65	5.280	5.189	91
CF_10	<a href="#">MCOQ00000000</a>	1.381.170	4.966.831	115	530.565	200.491	51,99	4.791	4.700	91
CF_11	<a href="#">MDCW00000000</a>	1.647.900	5.459.020	149	453.557	126.591	51,77	5.349	5.260	89
CF_12	<a href="#">MDCX00000000</a>	1.836.904	5.616.739	243	358.358	87.280	51,78	5.665	5.570	95
CF_13	<a href="#">MDCY00000000</a>	1.719.556	5.511.348	75	472.073	155.405	52,09	5.314	5.227	87
CF_14	<a href="#">MDCZ00000000</a>	1.803.666	5.336.368	112	1.016.321	373.288	51,59	5.263	5.170	93
CF_15	<a href="#">MDDA00000000</a>	1.965.166	5.360.377	114	486.148	230.190	51,67	5.200	5.108	92

### 4.6.2 Identificación taxonómica de las especies bacterianas.

Las 11 cepas fueron identificadas inicialmente como *Citrobacter freundii* complex mediante MALDI-TOF. Sin embargo, el análisis *in silico* de los genomas permitió asignar la taxonomía correcta a las especies utilizando la herramienta JSpeciesWS, que comparó los genomas por parejas y calculó el promedio de nucleótidos idénticos o la métrica ANI. Los 11 aislamientos mostraron valores de ANI > 95% confirmando que todos los aislamientos pertenecían a especie *C. freundii*. Dos de los aislamientos, CF\_1 (MCJD00000000) y CF\_4 (MCOM00000000), al compararse entre sí proporcionaron valores de ANI > 97,98%, lo que indicó que estaban estrechamente relacionados entre sí. Sin embargo, cuando se compararon con el resto de los genomas de *C. freundii* los valores de ANI fueron del 93-94% y se alejaban de los porcentajes obtenidos con los demás genomas, sugiriendo que estos dos aislamientos estaban alejados filogenéticamente del resto (Figura-33). Al revisar la clasificación actual pudimos comprobar que CF\_1 y CF\_4 habían sido reclasificadas como *Citrobacter portucalensis* dando lugar a las diferencias observadas en los valores de ANI.

	CF1_ST89.fasta	CF4_ST90.fasta	CF6_ST18.fasta	CF7_ST91.fasta	CF8_ST22.fasta	CF10_ST11.fasta	CF11_ST64.fasta	CF12_ST92.fasta	CF13_ST93.fasta	CF14_ST18.fasta	CF15_ST94.fasta	Citrobacter freundii CFNIH1
CF1_ST89.fasta	*	97.88	93.84	93.79	93.88	94.09	94.14	94.17	93.79	93.92	94.02	90.27
CF4_ST90.fasta	97.98	*	94.15	94.09	94.38	94.06	94.09	93.96	93.95	94.17	94.15	90.55
CF6_ST18.fasta	93.93	94.00	*	98.00	98.10	97.83	98.25	98.13	98.14	99.88	98.39	90.18
CF7_ST91.fasta	93.89	94.09	98.01	*	98.04	98.36	98.01	97.78	97.77	98.04	98.20	90.29
CF8_ST22.fasta	94.00	94.18	98.05	97.90	*	97.84	98.30	98.09	98.01	98.06	98.42	90.34
CF10_ST11.fasta	94.25	94.01	98.03	98.47	98.03	*	98.03	98.16	98.04	98.06	98.19	90.25
CF11_ST64.fasta	94.11	93.90	98.22	97.91	98.32	97.81	*	98.03	98.12	98.29	98.44	90.25
CF12_ST92.fasta	94.05	93.73	98.05	97.43	97.84	97.86	97.94	*	98.13	98.07	98.48	90.09
CF13_ST93.fasta	94.03	93.85	98.15	97.81	98.14	97.91	98.28	98.44	*	98.24	98.49	90.19
CF14_ST18.fasta	94.00	94.09	99.97	98.06	98.23	97.95	98.39	98.24	98.30	*	98.51	90.22
CF15_ST94.fasta	94.02	94.05	98.38	98.12	98.48	98.07	98.38	98.58	98.43	98.44	*	90.29
Citrobacter freundii CFNIH1	90.35	90.42	90.24	90.24	90.42	90.23	90.36	90.19	90.13	90.24	90.30	*

**Figura-33.** Valores de ANI para los genomas de *C. freundii* secuenciados.

La referencia utilizada en el alineamiento fue *C. freundii* CFNIH1.

### 4.6.3 Estudio del Resistoma.

Se confirmó mediante SGC que todos los aislamientos fueron productores de carbapenemasa, dando lugar a 10 aislamientos con *bla*<sub>VIM-1</sub>, 2 aislamientos con *bla*<sub>KPC-2</sub> y 1 aislamiento fue coproductor de 2 carbapenemasas (*bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>KPC-2</sub>) (Tabla 24). Además de los genes de carbapenemasas, se detectaron otros genes que afectaron a antibióticos diferentes de la familia de los  $\beta$ -lactámicos que podían tener localización en plásmidos o en el cromosoma bacteriano (Figura-34).

**Tabla 24.** Caracterización de los genes de resistencia y los elementos móviles en los aislamientos de *C. freundii*.

ID	Número Acceso	Tipo replicón	Integrón	Genes de resistencia a los antibióticos				
				β-Lactámicos	Aminoglucósidos	Fluoroquinolonas	Fenicoles	Trimetoprim/sulfametoxazol
CF_1	<a href="#">MCJD00000000</a>	IncP	---	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-71</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1A</sub></i>	<i>strB</i> , <i>aac(6')-31</i> , <i>aadA7</i> , <i>aac(3)-IIa</i>	<i>qnrB-43</i>	---	<i>sul-1</i>
CF_4	<a href="#">MCOM00000000</a>	IncL/M, IncFIB	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-77</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	<i>aadA2</i> , <i>aacA4</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>aadA1</i>	<i>qnrB-6</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catA1</i> <i>catA2 catB2</i>	<i>sul-1</i> , <i>sul-2</i> , <i>dfrB1</i> , <i>dfrA12</i>
CF_6	<a href="#">MCON00000000</a>	IncL/M, IncFIB, IncR	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CTXM-15</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i> , <i>bla<sub>DHA-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-79</sub></i>	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aadA1</i> , <i>aacA4</i> , <i>aadA5</i>	<i>qnrB-4</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catA1</i> , <i>catA2</i> , <i>catB2</i> , <i>catB3</i>	<i>sul-1</i> , <i>dfrA17</i> , <i>dfrB1</i>
CF_7	<a href="#">MCOO00000000</a>	IncL/M, Inc FIB	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-71</sub></i>	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aacA4</i> , <i>aac(6')-If</i>	<i>qnrB-38</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catA1</i> , <i>catB2</i>	<i>sul-1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrB1</i>
CF_8	<a href="#">MCOP00000000</a>	IncFII, Col R	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-10</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-48</sub></i>	<i>aacA4</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>aadA1</i>	<i>qnrA-1</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catB2</i>	<i>sul-1</i> , <i>sul-2</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrB1</i>
CF_10	<a href="#">MCOQ00000000</a>	IncL/M, Col R	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-66</sub></i>	<i>aadA1</i> , <i>aacA4</i>	<i>qnrB-35</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catB2</i>	<i>sul-1</i> , <i>dfrB1</i>
CF_11	<a href="#">MDCW00000000</a>	IncP, IncL/M, IncFIA, IncHI1A, IncHI1B	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-41</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1A</sub></i>	<i>aadA1</i> , <i>aacA4</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catA1</i> , <i>catB2</i>	<i>sul-1</i> , <i>dfrB1</i>
CF_12	<a href="#">MDCX00000000</a>	IncFIA	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1A</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-48</sub></i>	<i>aacA4</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>aadA1</i>	<i>qnrA-1</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catB2</i>	<i>sul-1</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrB1</i>
CF_13	<a href="#">MDCY00000000</a>	IncFII	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-75</sub></i>	<i>aadA1</i> , <i>aacA4</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	<i>qnrB-19</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catB2</i>	<i>sul-1</i> , <i>sul-2</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrB1</i>
CF_14	<a href="#">MDCZ00000000</a>	IncL/M, IncFIB	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CTXM-15</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-79</sub></i>	<i>aadA1</i> , <i>aacA4</i> , <i>aadA5</i>	<i>qnrB-19</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catA1</i> , <i>catB2</i>	<i>sul-1</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrB1</i>
CF_15	<a href="#">MDDA00000000</a>	IncL/M, IncHI1A, IncHI1B	In624	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-78</sub></i>	<i>aadA1</i> , <i>aacA4</i> ,	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>catB2</i>	<i>sul-1</i> , <i>dfrB1</i>



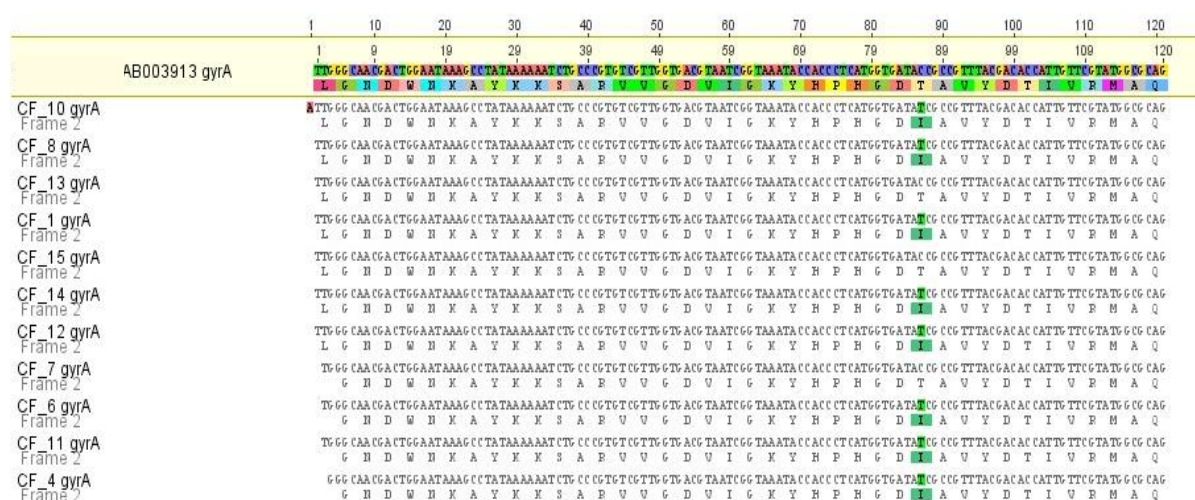
Aislamientos MLST	CF_1 ST-89	CF_4 ST-90	CF_6 ST-18	CF_7 ST-91	CF_8 ST-22	CF_10 ST-11	CF_11 ST-64	CF_12 ST-92	CF_13 ST-93	CF_14 ST-18	CF_15 ST-94
<b>β-lactámicos</b>											
<i>bla</i> TEM-1A											
<i>bla</i> TEM-1B											
<i>bla</i> OXA-1											
<i>bla</i> OXA-10											
<i>bla</i> CMY-41											
<i>bla</i> CMY-48											
<i>bla</i> CMY-66											
<i>bla</i> CMY-71											
<i>bla</i> CMY-75											
<i>bla</i> CMY-77											
<i>bla</i> CMY-78											
<i>bla</i> CMY-79											
<i>bla</i> DHA-1											
<i>bla</i> CTX-M-15											
<i>bla</i> KPC-2											
<i>bla</i> VIM-1											
<b>Aminoglucósidos</b>											
<i>aac</i> (6')-31											
<i>aac</i> (6')-If											
<i>aac</i> (3)-IIa											
<i>aac</i> (3)-IId											
<i>aad</i> A1											
<i>aad</i> A2											
<i>aac</i> A4											
<i>aad</i> A5											
<i>aad</i> A7											
<i>aph</i> (3')-Ia											
<i>aac</i> (6')Ib-cr											
<i>str</i> A											
<i>str</i> B											
<b>Quinolonas</b>											
<i>qnr</i> A-1											
<i>qnr</i> B-4											
<i>qnr</i> B-19											
<i>qnr</i> B-35											
<i>qnr</i> B-38											
<i>qnr</i> B-43											
<i>qnr</i> B-6											
<b>Fenicoles</b>											
<i>cat</i> A1											
<i>cat</i> A2											
<i>cat</i> B2											
<i>cat</i> B3											
<b>Trimetoprim/sulfametoxazol</b>											
<i>sul</i> -1											
<i>sul</i> -2											
<i>dfr</i> A1											
<i>dfr</i> A12											
<i>dfr</i> A14											
<i>dfr</i> A17											
<i>dfr</i> B1											
<b>Macrólidos</b>											
<i>mph</i> A											
<i>mph</i> E											
<i>msr</i> E											
<b>Tetraciclinas</b>											
<i>tet</i> A											
<i>tet</i> D											
<b>Rifampicina</b>											
<i>arr</i> -2											
<i>arr</i> -3											

**Figura-34.** Localización de los genes de resistencia basada en el análisis de ensamblado con plasmidSPAdes y plasmidFinder en los aislamientos de CFPC. Los genes de localización plasmídica se representan en gris y los cromosómicos de color negro.

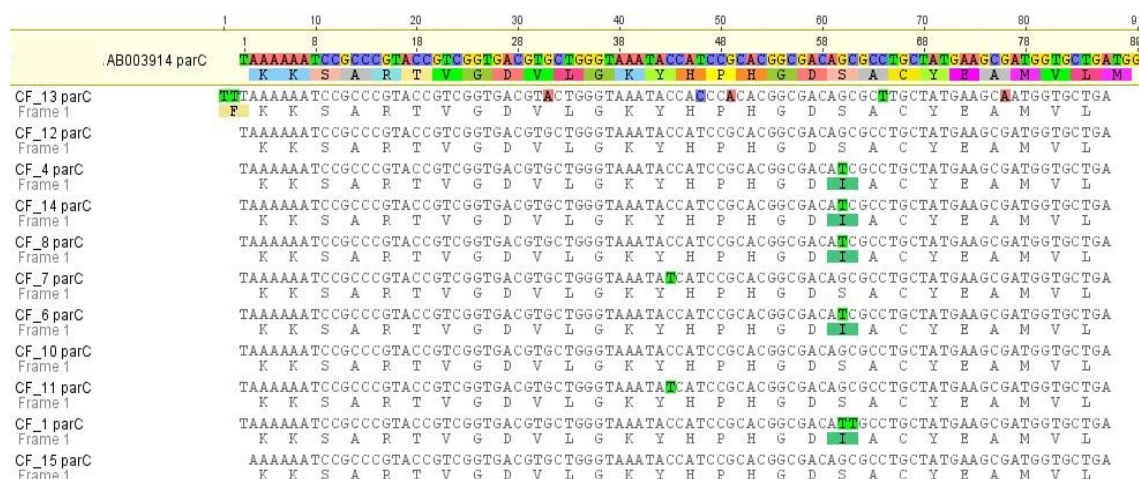
El análisis de la concordancia entre el fenotipo y el genotipo de los aislamientos confirmó que los aislamientos portadores del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> mostraron CMI a los carbapenémicos más elevadas que los aislamientos portadores de *bla*<sub>VIM-1</sub>, cuyas CMI se encontraron en rango de sensibilidad (Tabla 22). En cuanto a la resistencia a quinolonas, se comprobó que 6 de los aislamientos de *C. freundii* fueron resistentes a ácido nalidíxico (CMI > 16 mg/L) y ciprofloxacino (CMI >1 mg/L). Al analizar las mutaciones identificadas en los genes *gyrA* y *parC*, se confirmó que 5 aislamientos (CF\_1, CF\_4, CF\_6, CF\_8, CF\_14) presentaron mutaciones con cambio de aminoácido en *gyrA* (T83I) y en *parC* (S80I) y un aislamiento (CF\_12) con CMI>32mg/L para ciprofloxacino presentó una única mutación en *gyrA* (T83I), como se puede observar en los alineamientos múltiples representados en las Figura-35 y Figura-36. En el aislamiento CF\_12 se detectó la variante *qnrA1* que podría haber contribuido al aumento de la CMI de ciprofloxacino. Dos aislamientos de *C. freundii* fueron resistentes a ácido nalidíxico (CMI > 16 mg/L) y sensibles a ciprofloxacino (CMI < 1mg/L), y ambos presentaron mutación en *gyrA* (T83I). Los 3 aislamientos con ácido nalidíxico (CMI < 16mg/L) y ciprofloxacino (CMI < 1mg/L) sensibles no presentaron mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*. Por otro lado, en todos los aislamientos se detectaron otros determinantes de resistencia a quinolonas (*qnr* y *aac* (6')-*Ib-cr*) que podrían haber contribuido a la sensibilidad disminuida de las quinolonas. Finalmente, no se detectaron genes que codifican para las bombas de expulsión *qepA* y *OqxAB* en ninguno de los aislamientos (Tabla 24 y Tabla 25).

**Tabla 25.** Mutaciones en los genes *gyrA/parC* y el perfil de resistencia a quinolonas en los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas.

	CMI (mg/L)		Cambio de aminoácidos				Genes
	NAL	CIP	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>			
Aislamientos			83	87	79	83	
Referencia (AB003913)	<16	≤ 0,025	T (ACC)	D (GAC)	S (AGC)	E (GAA)	
CF_1	>16	6	I (ATC)	-	I (ATT)	-	<i>qnrB-43</i>
CF_4	>16	4	I (ATC)	-	I (ATC)	-	<i>qnrB-6, aac (6') Ib-cr</i>
CF_6	>16	>32	I (ATC)	-	I (ATC)	-	<i>qnrB-4, aac (6') Ib-cr</i>
CF_7	<16	0,023	-	-	-	-	<i>qnrB-38, aac (6') Ib-cr</i>
CF_8	>16	>32	I (ATC)	-	I (ATC)	-	<i>qnrA-1, aac (6') Ib-cr</i>
CF_10	>16	0,38	I (ATC)	-	-	-	<i>qnrB-35, aac (6') Ib-cr</i>
CF_11	>16	0,19	I (ATC)	-	-	-	<i>aac (6') Ib-cr</i>
CF_12	>16	>32	I (ATC)	-	-	-	<i>qnrA-1, aac (6') Ib-cr</i>
CF_13	<16	0,125	-	-	-	-	<i>qnrB-19, aac (6') Ib-cr</i>
CF_14	>16	>32	I (ATC)	-	I (ATC)	-	<i>qnrB-19, aac (6') Ib-cr</i>
CF_15	<16	0,006	-	-	-	-	<i>aac (6') Ib-cr</i>



**Figura-35.** Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *gyrA* de los aislamientos de CFPF con la referencia *C. freundii* (AB003913).



**Figura-36.** Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *parC* de los aislamientos de CFPF con la referencia *C. freundii* ([AB003914](#)).

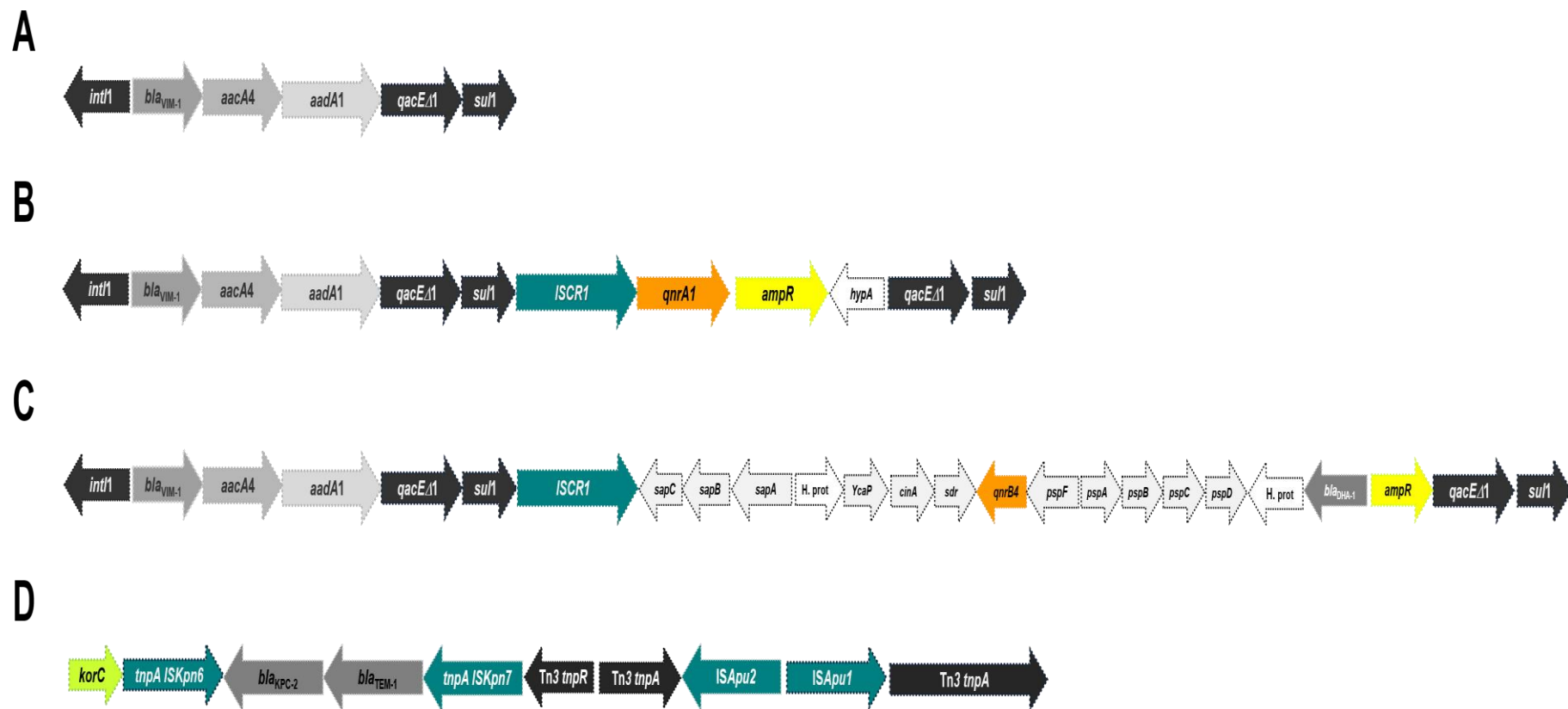
#### 4.6.4 Estudio del Moviloma.

##### A. Caracterización de los entornos genéticos de las carbapenemasas.

La secuencia del integrón fue comparado con las secuencias de integrones depositadas en la base de datos de INTEGRALL y se clasificó como integrón In624, igual que el detectado en los aislamientos de *E. cloacae* caracterizados en el primer estudio (Figura-37, Panel A). El estudio del entorno genético del gen *bla<sub>VIM-1</sub>* mostró que 3 aislamientos de *C. freundii* albergaban un integrón complejo de clase 1 que se caracterizó por presentar en la región *downstream* un gen *qnr*. Los integrones complejos que fueron detectados presentaron las siguientes estructuras (Figura-37, Panel B y C):

- [*In624*:ISCR1:*qnrA1*] de tamaño  $\approx 10.500$  pb  $\rightarrow$  CF\_8 y CF\_12
- [*In624*:ISCR1:*qnrB4*-*bla<sub>DHA-1</sub>*] de tamaño  $\approx 22.500$  pb  $\rightarrow$  CF\_6

Por otro lado, el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, que fue detectado en los aislamientos CF\_1 y CF\_11, y se encontraba formando parte de un fragmento de ADN de 10 kb de longitud que, a su vez, estaba asociado al transposón Tn3. El entorno genético de *bla*<sub>KPC-2</sub> incluyó en su estructura el gen  $\Delta$ *bla*<sub>TEM-1</sub> que se encontraba flanqueado por secuencias de inserción repetitivas, la transposasa Tn3 (*tpnA*), la resolvasa Tn3 (*tnpR*) y cuatro secuencias de inserción (*ISKpn6*, *ISKpn7*, *ISApu1*, *ISApu2*). Esta estructura fue comparada con las secuencias depositadas en GenBank y se encontró que fueron idénticas al 99% (cobertura 100%) con la secuencia de un plásmido detectado en *A. hydrophila* ([KR014106](#)) (Figura-37; Panel D).



**Figura-37.** Entornos genéticos de los genes *bla<sub>VIM-1</sub>* y *bla<sub>KPC-2</sub>*.

A) Integron simple de clase 1 (In624) asociado a *bla<sub>VIM-1</sub>*; B) Integron complejo de clase 1 (In624:ISCR1:*qnrA1*); C) Integron complejo de clase 1 (In624:ISCR1:*qnrB4-bla<sub>DHA-1</sub>*); D) Entorno genético de *bla<sub>KPC-2</sub>*.

## B. Análisis de plásmidos.

El análisis de plásmidos realizado con la herramienta PlasmidFinder en los 11 aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas, nos reveló la presencia de 7 plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncFIA, IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncL/M, IncP. El replicón más frecuentemente detectado fue el IncL/M, estando presente en 7 de los aislamientos, seguido de IncFIB, que se detectó en 4 aislamientos (Tabla 22). Los genes de las carbapenemasas *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>KPC-2</sub> fueron localizados en plásmidos en todos los aislamientos estudiados y esto se pudo demostrar gracias al ensamblado realizado con la herramienta plasmidSPAdes.

### 4.6.5 Estudio de tipificación molecular.

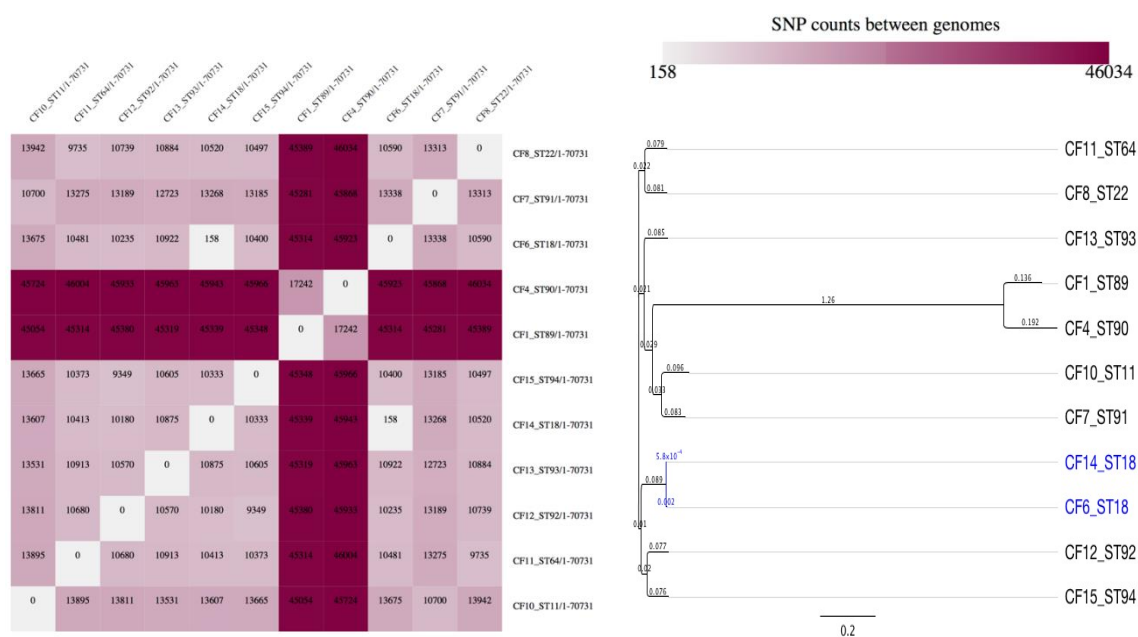
#### A. MLST.

El análisis *in silico* de MLST mostró la presencia de 10 STs diferentes, de los cuales, 4 STs habían sido previamente descritos en la literatura (ST11, ST18, ST22, ST64) y 6 STs se describieron en este trabajo (ST89, ST90, ST91, ST92, ST93, ST94) y se depositaron en la base de datos pubMLST (<http://pubmlst.org/cfreundii/>). En la Tabla 22 se muestra la equivalencia de los pulsotipos obtenidos respecto a los STs definidos.

#### B. SNPs.

El análisis de SNPs nos proporcionó información acerca del número de cambios que separaron a los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas. Al comparar los 11 genomas, detectamos que el número de SNPs encontrados osciló de 158 SNPs, en los genomas que estaban estrechamente relacionados, a 46.034, en los genomas que estaban más alejados filogenéticamente. Los aislamientos que se encontraron más estrechamente relacionados fueron los aislamientos CF\_6 y CF\_14 que pertenecían al ST18 y que tenían

158 SNPs de diferencia, considerándose la misma cepa. Por otro lado, los aislamientos CF\_1 y CF\_4, que pertenecían al ST89 y ST90, respectivamente, mostraron 17.242 SNPs de diferencia entre ellos y más de 45.000 SNPs de diferencia respecto a los demás genomas. Estos dos aislamientos coinciden con los aislamientos de *C. freundii* que fueron reclasificados como *C. portucalensis* y por esta razón podemos explicar que salgan más alejados en el árbol filogenético representado en la Figura-38. Los demás genomas mostraron una variación de SNPs que osciló entre 9.349 a 13.942 dando a entender que eran cepas diferentes pero que pertenecían a la especie de *C. freundii*.



**Figura-38.** Árbol filogenético basado en el análisis de SNPs de los 11 aislamientos de CFPC. El genoma de referencia utilizado fue *C. freundii* CFNIHI ([CP007557](#)).



## **5. Estudio molecular de los aislamientos de *Enterobacter hormaechei* productores de carbapenemasa tipo NDM-7 durante 2016 – 2017.**

### **5.1 Características generales.**

Durante el periodo 2016-2017 se detectaron 3 casos de infecciones/colonizaciones por aislamientos pertenecientes al complejo *E. cloacae* y que presentaron resistencia a múltiples familias de antimicrobianos, de entre ellos, a los antibióticos carbapenémicos con CMIs elevadas que se muestran en la Tabla 26. Los tres aislamientos correspondían a tres pacientes ancianos que presentaban diversas comorbilidades y que nunca habían viajado fuera de España.

#### **5.1.1 Descripción del caso nº 1.**

La primera paciente fue una mujer de 76 años que recibió un trasplante renal y que durante su hospitalización tuvo una ITU causada por una bacteria de la especie *E. cloacae complex* resistente a los carbapenémicos. Inmediatamente, se procedió al aislamiento de contacto de la paciente y se pusieron en marcha los protocolos de vigilancia activa de microorganismos multirresistentes implementados por el servicio de Medicina Preventiva del H12O. Durante los siete meses siguientes a este suceso, la paciente fue ingresada en varias ocasiones en el servicio de Nefrología y, durante aquellos ingresos, se obtuvieron 4 cultivos con *E. cloacae complex* resistente a carbapenémicos procedentes de muestras de orina y de exudados rectales (10/2016; 01/2017; 02/2017 y 03/2017). Todos los aislamientos mostraron el mismo perfil de resistencia, a excepción de los dos últimos, que además eran resistentes a cotrimoxazol.

### 5.1.2 Descripción del caso nº 2.

El segundo caso detectado fue un varón de 76 años que fue diagnosticado de ITU por *E. cloacae* complex resistente a carbapenémicos en su centro de atención primaria en el mes de enero de 2017. Este paciente tenía como antecedentes haber estado ingresado en nuestro hospital desde septiembre a diciembre del año 2016 en el servicio de Cirugía de Digestivo.

### 5.1.3 Descripción del caso nº 3.

El tercer caso fue una mujer de 81 años que ingresó en el servicio de Nefrología en febrero de 2017. A los 7 días de ingreso fue diagnosticada de una infección de piel y partes blandas causada por *E. cloacae* complex resistente a carbapenémicos.

## 5.2 Perfil de resistencia a los antibióticos.

Se aislaron un total de 9 aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos (ECC-RC) procedente de los 3 pacientes descritos anteriormente. Todos los aislamientos fueron identificados como *E. cloacae complex* mediante el sistema MALDI-TOF y todos mostraron un perfil de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, incluidos aztreonam, ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam y carbapenémicos, aminoglucósidos y quinolonas (Tabla 26). Todos los aislamientos fueron sensibles a amicacina, cotrimoxazol (EH\_1 y EH\_2) y tigeciclina.

## 5.3 Detección de carbapenemasas.

Las pruebas fenotípicas que se realizaron, tanto el THM, como el E-test MBL, mostraron resultados positivos para la producción de metalo- $\beta$ -lactamasa en los 3 aislamientos de ECC-RC. La PCR en tiempo real detectó el gen *bla<sub>NDM</sub>* en todos los aislamientos. Posteriormente, la secuenciación de los productos amplificados confirmó que fue la variante NDM-7.

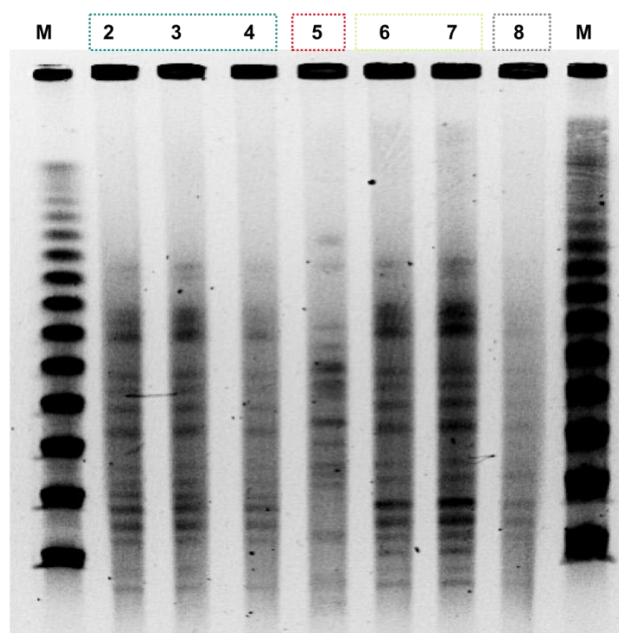
**Tabla 26.** Características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos.

Fenotipo														
Id.	Fecha	Servicio Diagnóstico	Tipo Infección	CMI (mg/L)										
				IPM*	MEM*	ETP*	GEN	TOB	AMK	NAL	CIP	SXT	FOF	TGC*
EH_1	03/08/2016	Nefrología	ITU	>32	>32	>32	>8	>8	4	>16	>2	<2/38	64	3
EH_2	17/01/2017	Atención Primaria	ITU	>32	>32	>32	>8	>8	4	>16	>2	<2/38	64	3
EH_3	21/02/2017	Nefrología	Piel y Partes Blandas	>32	>32	>32	>8	>8	4	>16	>2	>4/76	64	3
Genotipo														
Id.	PFGE // MLST	Tipo Replicón	Genes de Resistencia Antibiótica											
			β-Lactámicos	AMG	Quinolonas	Fenicoles	Fosfomicina	MLS	Sulfonamidas					
EH_1	A // ST78	IncA/C2	<i>bla</i> <sub>NDM-7</sub> , <i>bla</i> <sub>ACT-5</sub> , <i>bla</i> <sub>CTXM-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>aac</i> (6')/Ib-cr, <i>aac</i> (3)-IIa	<i>qnrS</i> -1, <i>aac</i> (6')/Ib-cr	<i>floR</i> , <i>catB4</i>	<i>fosA</i>	<i>mph</i> (A)	<i>sul</i> -2					
EH_2		IncFIB												
EH_3		IncX3												

\*CMI determinada por E-test

#### 5.4 Estudio de tipificación molecular por PFGE.

Los patrones electroforéticos obtenidos del campo pulsado fueron idénticos para todos los aislamientos de *E. cloacae* complex resistente a carbapenémicos y fueron denominados como “clon A”. En la Figura-39 se muestran los perfiles obtenidos de ECC-RC portadores de la carbapenemasa tipo NDM-7 de los 3 pacientes descritos anteriormente. Las posiciones 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> representan a los 3 aislamientos obtenidos del paciente n°1, la posición 5<sup>a</sup> es un aislamiento de *E. cloacae* utilizado como referencia y que no alberga ningún tipo de carbapenemasa, las posiciones 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> corresponden a los dos aislamientos de ECC-RC procedentes del paciente n° 2 y la posición 8<sup>a</sup> corresponde al aislamiento de ECC-RC del paciente n° 3.



**Figura-39.** PFGE de los aislamientos de *E. cloacae* complex resistente a carbapenémicos productores de NDM-7 procedentes de los pacientes 1, 2 y 3 incluidos en el estudio.

(M: marcador de peso molecular, *lambda ladder* PFGE, bioLabs, Inglaterra)

## 5.5 Secuenciación de genomas completos.

### 5.5.1 Descripción de las cepas.

Con la finalidad de conocer con más profundidad la epidemiología molecular de los aislamientos de ECC-RC portadores del gen *bla*<sub>NDM-7</sub>, se seleccionó el primer aislamiento obtenido de cada paciente para realizar la secuenciación del genoma completo y analizar las características moleculares de cada uno de ellos. Los aislamientos se denominaron como EH\_1 (paciente nº1), EH\_2 (paciente nº2) y EH\_3 (paciente nº3) y fueron secuenciados mediante la plataforma de Illumina HiSeq2500, a partir de la preparación de librerías Nextera DNA, generando una profundidad de 150X, con unas lecturas *paired-end* de 100 pb de longitud y un tamaño de inserto de 300 pb.

El tamaño medio de los 3 genomas fue de 5.011.444 pb con un 59,9% de contenido en G+C y el resultado del ensamblado de las lecturas dio como resultado la obtención de 75 *contigs* de media con un N50 de 183.265 pb. Todos los genomas fueron depositados en la base de datos GenBank asignándoles los números de acceso correspondientes. Los detalles de las métricas obtenidas en la secuenciación se muestran en la Tabla 27.

**Tabla 27.** Características de los genomas de los aislamientos de *E. cloacae* complex resistentes a carbapenémicos productores de NDM-7 y descripción de las métricas del ensamblado y de anotación.

Id.	Nº Acceso	Lecturas Totales	Tamaño Genoma (pb)	Contigs (≥500pb)	Contig Largo (pb)	N50 (pb)	GC (%)	Genes Totales	CDS Total	Genes RNA	ARNr (5S, 16S, 23S)	ARNt
EH_1	<a href="#">QVNP00000000</a>	22.495.060	5.012.235	79	792.424	181.413	54,16	4.995	4.922	73	1, 3, 5	57
EH_2	<a href="#">QNVQ00000000</a>	19.603.842	4.975.968	81	582.257	141.836	54,34	4.999	4.926	73	1, 3, 7	55
EH_3	<a href="#">QVNR00000000</a>	24.679.608	4.981.676	69	777.033	226.548	54,90	4.984	4.915	69	1, 3, 4	54

### 5.5.2 Identificación taxonómica de las especies bacterianas.

Los 3 aislamientos fueron identificados como *E. cloacae* complex mediante el sistema MALDI-TOF. Posteriormente, el análisis *in silico* de los genomas utilizando la herramienta JSpeciesWS clasificó a las especies como *Enterobacter hormaechei* con unos resultados de ANI mayores del 99%. *E. hormaechei* es una especie que se encuentra estrechamente relacionada con *E. cloacae* (65%) y que fue definida por primera vez en 1989 (168).

### 5.5.3 Estudio del Resistoma.

Los 3 aislamientos fueron resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo carbapenémicos y los nuevos antibióticos ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam. La SGC confirmó que todos los aislamientos fueron portadores de la MBL *bla*<sub>NDM-7</sub>, además de albergar la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido *bla*<sub>CTXM-15</sub> y otros genes que afectaron a  $\beta$ -lactámicos y que se describen en más profundidad en la Tabla 26. El genotipo detectado con SGC se mostró concordante con el fenotipo expresado en las cepas EH\_1, EH\_2 y EH\_3, excepto en los aislamientos EH\_1 y EH\_2 que dieron como resultados CMI's para cotrimoxazol en rango de sensibilidad, a pesar de portar el gen *sul2* responsable de la resistencia a sulfonamidas. Todos los genes detectados a través de los servidores web de ResFinder y CARD tuvieron localización plasmídica, a excepción de *bla*<sub>ACT-5</sub> (variante de la  $\beta$ -lactamasa AmpC) y *fosA* (gen que inactiva fosfomicina por la incorporación de una molécula de glutatión), que se localizaron en el cromosoma bacteriano. El gen *fosA* suele ir asociado a plásmidos, sin embargo, algunas especies de *Enterobacterales* (*Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *S. marcescens*) presentan genes cromosómicos homólogos de *fosA* y pueden presentar sensibilidad disminuida a fosfomicina.

#### 5.5.4 Estudio del Moviloma.

##### A. Caracterización del entorno genético de NDM-7.

El gen *bla*<sub>NDM-7</sub> se encontró formando parte de una secuencia genética que presentaba la siguiente estructura:

- *IS26-dsbC-trpF-ble*<sub>MBL</sub>-*bla*<sub>NDM-7</sub>- $\Delta$ *ISAba125-IS5*- $\Delta$ *ISAba125*.

En dirección *upstream* del gen *bla*<sub>NDM-7</sub> se localizaron los genes *ble*<sub>MBL</sub> (codifica la resistencia a bleomicina, *brp*), el gen *trpF*, el gen *dsbC* (gen que participa en la formación de puentes disulfuros nativos y que juega un papel importante en el plegamiento de las proteínas y estabiliza la estructura) e *IS26*. En la región *downstream* se puede observar cómo *IS5* se inserta en el interior de la secuencia *ISAba125*, ubicada en posición adyacente al gen *bla*<sub>NDM-7</sub>, dando lugar a dos segmentos cuya funcionalidad está truncada y con tamaños de aproximadamente 1.000 pb y 70 pb, respectivamente.

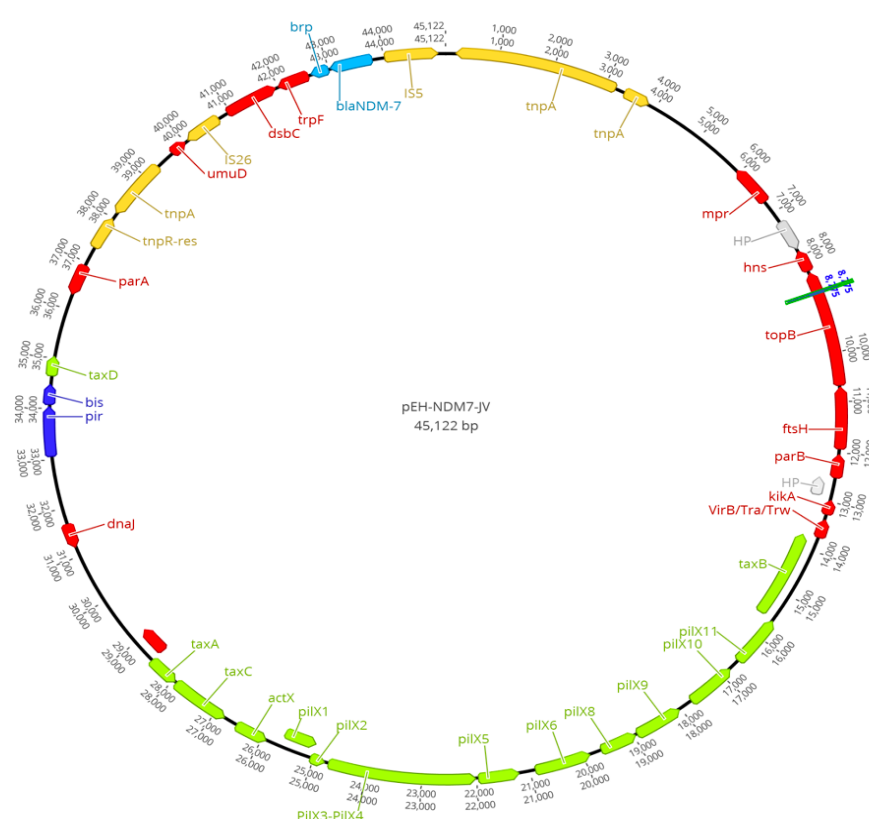
##### B. Análisis de plásmidos.

El análisis mediante PlasmidFinder para determinar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos reveló la presencia de 3 replicones pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad (IncA/C2, IncFIB, IncX3). Estos resultados fueron confirmados a través de la anotación de los *contigs* obtenidos mediante el algoritmo de PlasmidSPAdes.

El gen *bla*<sub>NDM-7</sub> se localizó en un plásmido de 45.122 pb perteneciente al grupo de incompatibilidad IncX3 y que, a su vez, estaba integrado en la secuencia genética explicada en el apartado anterior. La estructura de los plásmidos fue idéntica en los 3 aislamientos y se le denominó como pEH-NDM-7-JV (Figura-40). El plásmido pEH-NDM-7-JV mostró una



estructura 100% idéntica al plásmido pOM26-1 ([KP776609](#)) descrito anteriormente por Chen y cols (169). La estructura del plásmido pEH-NDM-7-JV estaba compuesta por genes que participan en la replicación (*pir* y *bis*), genes que forman la parte más conservada del plásmido (*parA*, *parB*, *umuD*, *dsbC*, *trpF*, *mpr*, *hns*, *topB*, *ftsH*, *kikA*, *dnaJ*), genes que participan en los procesos de conjugación (*pil* y *tax*), genes adquiridos que incluyen los genes de resistencia a los antibióticos (*bla*<sub>NDM-7</sub>, *brp*) y genes que codifican elementos móviles que participan en la transferencia horizontal (*tnpA*, *tnpR*, *IS5*, *IS26*).



**Figura-40.** Estructura del plásmido IncX3 pEH-NDM-7-JV.

Las flechas representan la dirección de la transcripción y los marcos de lectura. En azul se indican los genes de resistencia adquiridos y en amarillo los elementos móviles. Los genes de la región conservada se representan de color rojo y las proteínas que no tienen anotación se identifican con flechas de color gris. En verde se representan los genes que participan en la conjugación y en azul los genes que participan en la replicación.

### 5.5.5 Estudio de tipificación molecular.

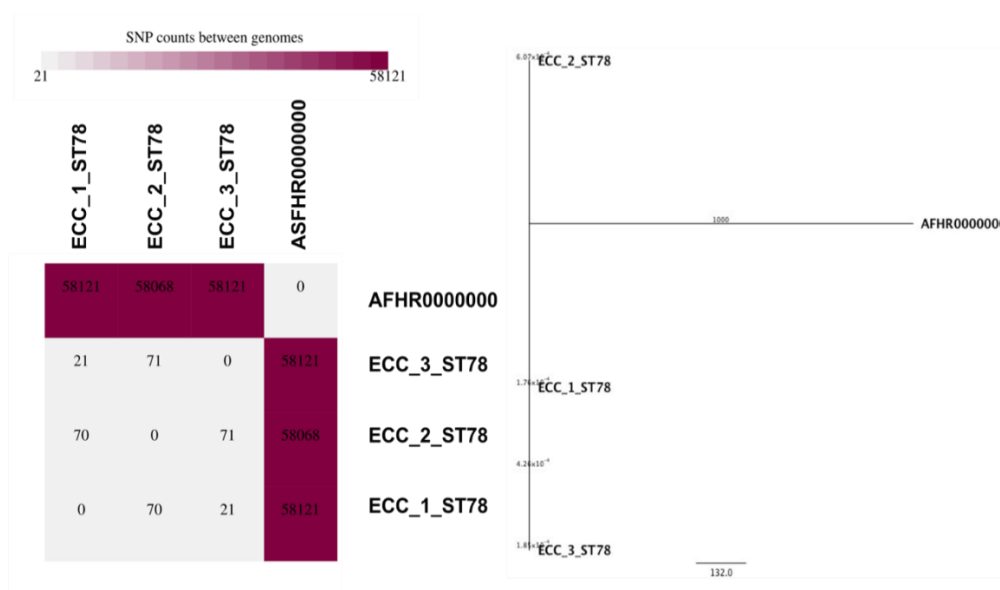
#### A. MLST.

El análisis *in silico* de MLST determinó que los 3 aislamientos de *E. hormaechei* pertenecían al ST78 cuyos alelos se muestran a continuación:

Locus	Identidad (%)	Longitud (pb)	Gaps	Alelo
<i>dnaA</i>	100	442	0	8
<i>fusA</i>	100	646	0	9
<i>gyrB</i>	100	434	0	6
<i>leuS</i>	100	578	0	9
<i>pyrG</i>	100	259	0	9
<i>rplB</i>	100	607	0	6
<i>rpoB</i>	100	545	0	8

#### B. SNPs.

El análisis filogenético basado en la aproximación de SNPs dio como resultado que los 3 aislamientos de *E. hormaechei* estaban estrechamente relacionados teniendo menos de 80 SNPs de diferencia entre ellos. Los aislamientos EH\_1 vs. EH\_2 y EH\_2 vs. EH\_3 tuvieron una diferencia de 71 SNPs, mientras que, los aislamientos EH\_1 y EH\_3 únicamente se diferenciaban en 21 SNPs como se puede observar en la Figura-41. Para la construcción de árbol filogenético, se realizó un alineamiento múltiple frente al genoma de referencia de *Enterobacter hormaechei subsp. hormaechei* ATCC 49162 ([AFHR000000000](#)) con BWA seguido de una llamada a variantes con SAMtools.



**Figura-41.** Árbol filogenético basado en el análisis de SNPs de los 3 aislamientos de *E. hormaechei* productores de *bla*<sub>NDM-7</sub>. Los aislamientos están denominados como ECC (*Enterobacter cloacae* complex) y se están refiriendo a EH.

**Tabla 28.** Características de los genomas de las EPC y descripción de las métricas del ensamblado.

ID	Nº Acceso	Plataforma Secuenciación	Ensamblador (versión)	Lecturas Totales	Tamaño Genoma (pb)	Contigs (≥500bp)	Contig Largo (pb)	N50	GC (%)	Total Genes	Total CDS	Genes RNA
EC_38	<a href="#">ATHX000000000</a>	Junior 454	Newbler 2.7	338.715	5.155.870	90	556.526	262.093	54,80	4.999	4.864	79
KP_63	<a href="#">JNHB000000000</a>	Junior 454	Newbler 2.7	400.168	5.580.994	124	356.084	203.680	61,80	5.342	5.198	89
CF_1	<a href="#">MCJD000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.702.746	5.372.632	178	505.183	155.341	52,05	5.226	5.147	79
CF_4	<a href="#">MCOM000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.583.316	5.288.804	81	1.079.316	426.377	51,83	5.082	4.996	86
CF_6	<a href="#">MCON000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.625.756	5.394.131	126	530.789	375.062	51,59	5.327	5.231	96
CF_7	<a href="#">MCOO000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.682.216	5.279.224	133	596.601	199.021	51,88	5.128	5.037	91
CF_8	<a href="#">MCOP000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.669.822	5.418.698	151	440.943	127.768	51,65	5.280	5.189	91
CF_10	<a href="#">MCOQ000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.381.170	4.966.831	115	530.565	200.491	51,99	4.791	4.700	91
CF_11	<a href="#">MDCW000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.647.900	5.459.020	149	453.557	126.591	51,77	5.349	5.260	89
CF_12	<a href="#">MDCX000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.836.904	5.616.739	243	358.358	87.280	51,78	5.665	5.570	95
CF_13	<a href="#">MDCY000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.719.556	5.511.348	75	472.073	155.405	52,09	5.314	5.227	87
CF_14	<a href="#">MDCZ000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.803.666	5.336.368	112	1.016.321	373.288	51,59	5.263	5.170	93
CF_15	<a href="#">MDDA000000000</a>	MiSeq	SPAdes 3.6.2	1.965.166	5.360.377	114	486.148	230.190	51,67	5.200	5.108	92
EH_1	<a href="#">QNVF000000000</a>	HiSeq2500	SPAdes 3.12.0	22.495.060	5.012.235	79	792.424	181.413	54,16	4.995	4.922	73
EH_2	<a href="#">QNVQ000000000</a>	HiSeq2500	SPAdes 3.12.0	19.603.842	4.975.968	81	582.257	141.836	54,34	4.999	4.926	73
EH_3	<a href="#">QNVR000000000</a>	HiSeq2500	SPAdes 3.12.0	24.679.608	4.981.676	69	777.033	226.548	54,90	4.984	4.915	69

## DISCUSIÓN

La emergencia y diseminación de EPC representa un problema de primer orden en la salud pública de todo el mundo, debido fundamentalmente a las limitaciones que se generan en el arsenal terapéutico antimicrobiano. Durante todos estos últimos años, hemos podido observar como emergían las primeras cepas de *Enterobacterales* MDR o XDR, principalmente mediadas por carbapenemasas, y como, a pesar de la implementación de los protocolos de infección hospitalaria, estas resistencias se diseminaban en los hospitales y centros sociosanitarios, y más tarde también en la comunidad. Para la sanidad pública es un reto muy importante, ya que muchos de los pacientes que ingresan en nuestros hospitales pueden ser eventualmente portadores asintomáticos de estos microorganismos en su microbiota intestinal. Además, las infecciones causadas por estos microorganismos suelen asociarse con altas tasas de mortalidad, largas estancias hospitalarias y un elevado coste de hospitalización (170). De entre las especies de EPC que más frecuentemente se han detectado hasta el momento, destaca *K. pneumoniae* mientras que otras especies de *Enterobacterales* han sido detectados con mucha menor frecuencia (24, 174). En cuanto a los tipos de carbapenemasas más comúnmente detectados se encuentran las enzimas KPC, VIM, NDM y OXA-48 (24).

Esta tesis proporciona una visión global de la epidemiología molecular de las infecciones/colonizaciones por EPC en un hospital de tercer nivel desde que emergieron las primeras cepas de EPC y durante un periodo de 10 años. En este trabajo se analiza la diseminación y complejidad de estos microorganismos, incluyendo un análisis detallado de los genes relacionados con la resistencia a los antimicrobianos (“resistoma”), y también, de los elementos genéticos que participan y facilitan la transferencia horizontal de estos determinantes de resistencia (“moviloma”). Para realizar estos estudios, se han utilizado progresivamente, además de los métodos clásicos ya establecidos en la epidemiología molecular microbiana, las nuevas tecnologías de secuenciación de genoma completo. Los resultados recogidos en esta tesis muestran que la incidencia de infecciones causadas por

EPC ha tenido una tendencia ascendente a lo largo del periodo de estudio y esto se debió fundamentalmente a la producción de carbapenemasas como principal mecanismo de resistencia. Hasta tres especies diferentes del orden *Enterobacterales* fueron productoras de carbapenemasas (*K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *C. freundii*), y estuvieron involucradas en las infecciones/colonizaciones que afectaron a pacientes ingresados en diferentes servicios clínicos del hospital, destacando *K. pneumoniae* productora de OXA-48 como la especie predominante durante todo el periodo de estudio.

### **1. Diseminación policlonal de aislamientos de *E. cloacae* productores de carbapenemasa tipo VIM-1.**

En este primer estudio se describió la epidemiología molecular de los aislamientos de *E. cloacae* que mostraron una sensibilidad disminuida a los carbapenémicos y un fenotipo de multirresistencia. Estos 5 años que duró el estudio nos permitió obtener una visión general acerca de la diversidad clonal de estos aislamientos, de la persistencia de algunos clones específicos, así como, de los principales mecanismos implicados en la resistencia a los carbapenémicos y caracterizar los EGMs implicados en la diseminación de dichos genes.

Los resultados de esta tesis muestran que *E. cloacae* fue la primera especie portadora de una carbapenemasa detectada en nuestro hospital, y que la carbapenemasa tipo VIM-1 fue la predominante en la mayoría de los aislamientos. A pesar de que *E. cloacae* no es tan frecuente, es importante no olvidarse de esta especie, ya que se encuentra dentro del denominado grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp.*), en el cual, están incluidos los microorganismos multirresistentes que deben vigilarse según la OMS (80). Un estudio reciente, en el que se llevó a cabo el análisis de la epidemiología global de *Enterobacterales* productores de VIM, mostró que las especies más frecuentes asociadas a este tipo de carbapenemasa fueron *K. pneumoniae* y, en segundo lugar, *E. cloacae* complex (56). Los

brotes y los casos asociados a *E. cloacae* productor de carbapenemasas han sido detectados en los hospitales de todo el mundo, incluido en España (55,112,121,173). Los países que mostraron mayor prevalencia de *E. cloacae* productores de VIM-1, durante los años 2007 a 2011, fueron los países del sur de Europa (Grecia, Italia) y de Asia (5,174).

En este estudio, además de identificar la carbapenemasa tipo VIM-1, se detectaron otros tipos de carbapenemasas (KPC-2 y VIM-2). Las enzimas tipo VIM presentan una diseminación global. Se han detectado mayoritariamente en *P. aeruginosa*, sin embargo, cada vez es más frecuente encontrar casos de *Enterobacterales* productores de VIM, sobre todo en Europa y particularmente en Grecia, España, Hungría e Italia (5,56,175). Sin embargo, a diferencia de los resultados mostrados en un estudio multicéntrico español en el que la carbapenemasa tipo OXA-48 resultó ser la más prevalente, en nuestra colección no se detectó ningún caso de *E. cloacae* productor de OXA-48 (117). Es importante tener en cuenta la epidemiología local de cada hospital, ya que puede estar influyendo en la emergencia de algún tipo de carbapenemasa específica o en la aparición de una especie en particular.

Al analizar los resultados, encontramos que existió una gran diversidad clonal entre los aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM-1, esto nos sugirió que la diseminación de estos aislamientos no dependió de la propagación de un único clon, sino que era policlonal, y que, probablemente, la diseminación del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> estuvo asociada con algunos EGMs que eran compartidos por estos microorganismos. El gen *bla*<sub>VIM-1</sub> se localizó en un plásmido perteneciente al grupo de incompatibilidad IncHI2. Los plásmidos de tipo IncHI2 suelen encontrarse con frecuencia en cepas clínicas de *Enterobacterales* y se han vinculado con la diseminación de los genes de resistencia de tipo *bla*<sub>CTXM-2</sub>, *bla*<sub>CTXM-9</sub> y *qnr*, que afectan a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y quinolonas, y que son utilizados diariamente en la práctica clínica (90). En un estudio realizado por *Matsumura y cols*, se detectaron hasta nueve genes de resistencia antibiótica que se asociaron a los plásmidos portadores del gen *bla*<sub>VIM</sub> (176).



Nuestros hallazgos, junto con la información recogida en la literatura científica, sugieren que los plásmidos conjugativos, como IncHI2, son los principales responsables del intercambio de genes de resistencia entre los diferentes aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM-1, e incluso entre diferentes especies de *Enterobacterales* (90, 176). No obstante, existen numerosos estudios que describen que la carbapenemasa VIM-1 puede ser vehiculizada por plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad, tanto de amplio rango (IncL/M, IncC, IncN), como de estrecho rango (IncI1, IncW, IncA/L, IncR, IncX3) (55,112,121,173,176–178). En Grecia, se han descrito plásmidos del grupo IncN asociados a VIM-1 en diferentes especies de *Enterobacterales*, incluyendo la especie de *E. cloacae*. Es importante señalar que en España, en hospitales de Madrid y Barcelona, se ha detectado la presencia del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> asociado a un plásmido del grupo IncHI2 de tamaño parecido al encontrado en nuestro estudio en la especie de *E. cloacae* (55,112,121,173).

Otro de los resultados relevantes de este estudio fue que el gen *bla*<sub>VIM-1</sub> se detectó en dos tipos de integrones (In624 e In488). Según lo descrito en la literatura, las carbapenemasas de tipo VIM suelen estar asociadas mayoritariamente a una gran variedad de integrones cuya estructura suele contener varios *cassettes* génicos de resistencia a los antibióticos (56). Los integrones caracterizados en este trabajo ya fueron descritos en estudios anteriores. El integrón In624 (*intl-bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA4-dfrB1-aadA1-catB2-qacEΔ1/su1*) fue detectado en aislamientos de *K. pneumoniae*, y el integrón In488 (*intl-bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA4-aadA1-qacEΔ1/su1*) en *E. cloacae* (121). El integron In624, que originalmente se denominó como In113, está distribuido y diseminado por España y se ha visto asociado a diferentes especies, como *K. pneumoniae* y *Enterobacter kobei* (55,56,179). A pesar de que el In110 se ha asociado frecuentemente con *bla*<sub>VIM-1</sub> y se ha distribuido por España, en nuestros estudios no lo hemos encontrado.

Curiosamente, en este trabajo detectamos aislamientos de *E. cloacae* VIM-1 que se clasificaron dentro del mismo clon con diferente tipo de integrón. Estos resultados sugirieron una menor resolución del PFGE para establecer la relación filogenética entre las cepas. Por este motivo, cada vez se hace más necesario la implementación de nuevas tecnologías basadas en la secuenciación de genomas completos de bacterias en los laboratorios de microbiología, con el fin de llevar a cabo unos análisis filogenéticos más completos basados en diferentes aproximaciones como son, el análisis de SNPs o wgMLST (“*Whole Genome Multilocus Sequence Typing*”) (146,147,180).

Para complementar y confirmar los hallazgos obtenidos en este primer estudio decidimos realizar la SGC de una cepa representativa de uno de los clones de *E. cloacae* productor VIM-1 (EC\_38). El análisis confirmó la presencia del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> asociado con el integron In624 y con el plásmido IncHI2. Se detectaron otros genes de resistencia a antibióticos que coincidieron con el fenotipo de multirresistencia que presentaba dicha cepa. En cuanto a la clasificación taxonómica de la especie, inicialmente fue identificada como *E. cloacae* complex, sin embargo, fue reclasificada, gracias al análisis computacional, como *E. roggenkampii*, definida como nueva especie dentro uno de los clados de *E. cloacae* complex (181). Muchos de los artículos científicos y de secuencias depositadas en la base de datos de GenBank han sido identificadas de forma incorrecta como *E. cloacae* y, por este motivo, en los últimos años se han publicado algunos estudios donde se comparan las secuencias de los genomas pertenecientes a este complejo, con el objetivo de definir correctamente la clasificación (181). Según nuestro conocimiento, no se ha detectado hasta el momento ningún aislamiento de *E. roggenkampii* productor de VIM-1. Sin embargo, debido a la incorrecta identificación por parte de los estudios científicos ya publicados, no podemos asegurar que nuestros resultados sean los únicos que demuestran el aislamiento de *E. roggenkampii* productor de VIM-1.

En general, se ha demostrado que la presencia de los EGMs, ya sean integrones o plásmidos, juegan un papel muy importante en la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos entre bacterias de diferente género y especie. Desde un punto de vista epidemiológico, es importante conocer los mecanismos de selección y de diseminación de estos genes de resistencia en el ámbito hospitalario. Los resultados obtenidos en esta fase del estudio sugieren que, la emergencia de *E. cloacae* productor de carbapenemasa fue policlonal, y que la diseminación de la carbapenemasas tipo VIM-1 entre los aislamientos clínicos de *E. cloacae* se debió, fundamentalmente, a la transferencia horizontal de un plásmido de gran tamaño que, a su vez, estaba asociado a un integron que contenía otros determinantes de resistencia antibiótica.

### **2. Emergencia y diseminación del clon de alto riesgo de *K. pneumoniae* ST11 productor de OXA-48.**

Durante los primeros años de estudio (2009-2014), se detectó la emergencia de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de VIM-1 con una gran diversidad clonal. Algunas de estas cepas fueron responsables de pequeños brotes que tuvieron lugar en servicios clínicos específicos, como la UCIN y el servicio de Nefrología. Sin embargo, este escenario epidemiológico cambió hacia una diseminación clonal por parte del clon ST11 de *K. pneumoniae* productor de OXA-48, que emergió y desplazó a la mayoría de los clones de *K. pneumoniae* productores de VIM-1. Este estudio reveló que en nuestro hospital la carbapenemasa más frecuentemente identificada en la especie de *K. pneumoniae* fue OXA-48 (61%), seguida de VIM-1 (38%) y KPC-2 (1%). En Europa, se han reportado numerosos estudios donde se describen brotes hospitalarios causados por *K. pneumoniae* productora de OXA-48 concentrándose en su mayoría en países como Alemania, España, Francia, Grecia, Italia, Noruega, Países Bajos y Reino Unido (102,182–184). Sin embargo, en otras partes del mundo, la carbapenemasa más prevalente en *K. pneumoniae* es la de tipo KPC, que se ha

visto involucrada en numerosos brotes hospitalarios afectando a pacientes de todos los continentes (185).

Los brotes hospitalarios que ocurrieron durante la etapa de nuestro estudio afectaron a pacientes adultos y pediátricos. Los pacientes adultos se caracterizaron por tener una mediana de edad de 68 años, por haber estado previamente colonizados y por haber recibido tratamiento antibiótico previo. Por otro lado, los pacientes pediátricos se relacionaron con un brote que ocurrió en la UCIN entre los años 2009-2011. El análisis de las características clínicas de los pacientes no identificó factores de riesgos específicos que se asociasen con la adquisición del clon ST11 y, tampoco se pudo establecer la trazabilidad de su diseminación en nuestra institución. Sin embargo, merece la pena destacar que 6 de los pacientes que se vieron afectados por *K. pneumoniae* OXA-48 pertenecientes al clon ST11 habían sido trasladados desde centros sociosanitarios al hospital. En este sentido, es conocido que los hospitales y los centros sociosanitarios suelen estar conectados por el flujo o intercambio de pacientes que suele haber entre sus instalaciones. Se ha demostrado que los centros sociosanitarios suelen servir de reservorios de bacterias multirresistentes y que pueden dar lugar al origen de brotes cuando estos pacientes ingresan en el hospital y existe una transmisión de estas bacterias multirresistentes hacia otros pacientes (186). Además, un trabajo reciente sugiere que los principales factores de riesgo para adquirir *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa son el contacto con la atención sanitaria, el uso previo de antimicrobianos y los procedimientos invasivos a los que están sometidos los pacientes (187).

El estudio de tipificación molecular mostró la existencia de 20 clones diferentes que estuvieron circulando por el hospital entre 2009 a 2014. De entre todos ellos, destacó un clon que agrupó a la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* OXA-48 y que fue capaz de desplazar a los demás clones y de diseminarse por todo el hospital, persistiendo hoy en día (resultados no mostrados). Este clon se identificó como ST11, perteneciente al complejo clonal CC258, y que se ha considerado como un clon de alto riesgo (46). Según la definición

propuesta por *Woodford y col.*, un clon de alto riesgo se refiere a aquellos aislamientos agrupados dentro del mismo ST, según MLST, y que pueden haber sido aislados de áreas geográficas y tiempos diferentes (124). Los clones de alto riesgo tienen la capacidad de albergar genes de resistencia y virulencia en el interior de EGMs y estas características hacen que sean agentes potencialmente peligrosos, persistentes y/o transmisibles en el ámbito hospitalario, por tanto, es recomendable llevar a cabo su identificación rápida y una vigilancia epidemiológica para evitar su expansión.

El complejo clonal CC258 de *K. pneumoniae* es el responsable de causar los brotes más significativos ocurridos en el mundo. Este CC se compone de 3 STs (ST258, ST11, ST512), de los cuales, el ST258 es el clon más extendido. El clon ST258 es un clon híbrido que se aisló por primera vez en el año 2000 y que se originó por la recombinación de los clones ST11 y ST442. El clon ST258 está formado por dos linajes genéticos (clado I y clado II). El clado I se asoció más frecuentemente con la adquisición de *bla*<sub>KPC-2</sub> y el clado II con *bla*<sub>KPC-3</sub>. La diferencia genética entre estos dos clados radica en una región de 215 Kb que incluye genes involucrados en la síntesis de polisacáridos capsulares (*cps1* y *cps2*). Esta región de divergencia es el sitio donde tienen lugar las recombinaciones, lo que sugiere que esta región pudo contribuir a la diseminación exitosa de este clon (105).

Por otro lado, el segundo CC más prevalente de *K. pneumoniae* es el CC15, que está formado por ST14 y ST15 (80). Un estudio europeo publicado en 2013, en el que analizó una colección de 67 *K. pneumoniae* productoras OXA-48, mostró una gran diversidad clonal. Se identificaron 26 STs diferentes, entre los que se incluyó el clon ST11, sin embargo, el clon más representado fue el ST101 (188). A pesar de que el clon ST258 es el más prevalente a nivel mundial, en nuestro estudio no se detectó ningún aislamiento perteneciente a dicho clon. Sin embargo, si se identificaron otros clones de alto riesgo, como el clon ST11 y el clon ST15.

El primer aislamiento clínico de *K. pneumoniae* ST11 detectado en nuestro hospital fue en 2011 y portaba los genes *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>CTXM-15</sub>. A partir de ese momento se describieron casos esporádicos en el hospital, hasta que, en julio de 2013 se identificó el primer caso de *K. pneumoniae* OXA-48 perteneciente al clon ST11. Desde la emergencia del clon ST11 por primera vez en Francia en 1997, se han descrito numerosos brotes de este clon asociados con la adquisición de BLEEs y de carbapenemasas de tipo OXA-48, VIM, KPC, NDM (182,189–192). El clon ST11 de *K. pneumoniae* productor de KPC es el más frecuentemente detectado en Asia (China), también se ha detectado en Latinoamérica, República Checa, Suiza, Tailandia, Australia y Grecia relacionado con la producción de NDM (46,104). En España, un estudio multicéntrico, en el que participaron 83 hospitales, identificaron a los clones ST11 y ST15 de *K. pneumoniae* productor de OXA-48 como los más prevalentes, dando lugar a una amplia propagación interregional por todo el país a expensas principalmente de estos dos clones exitosos de *K. pneumoniae* OXA-48 (103). Los resultados reportados en el estudio español fueron concordantes con la situación acontecida en nuestra institución durante la etapa del estudio.

En este trabajo se llevó a cabo un análisis molecular, a través de la SGC, de una cepa representativa de uno de los brotes, KP\_ST11\_OXA-48, que afectó al mayor número de pacientes. Los resultados de este análisis mostraron que esta cepa presentaba un resistoma complejo, en el que se detectó la presencia de hasta 121 genes de resistencia a antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, fenicoles y sulfonamidas), metales (arsénico, cadmio, cobalto, cobre, cromo, mercurio, zinc) y biocidas (clorhexidina, dodecil sulfato sódico, cloruro de benzalconio, triclosán y compuestos de amonios cuaternarios). Es conocido que las cepas de *K. pneumoniae*, adaptadas al medio hospitalario, tienen la capacidad de albergar en su genoma varios genes de resistencia a antibióticos dando lugar a un “súper resistoma” (80). La complejidad del resistoma de la cepa KP\_ST11\_OXA-48 nos sugirió que la persistencia de este clon actualmente en el hospital pudiera deberse a la presión selectiva,

no sólo por el uso de antibióticos, sino también, de la utilización de desinfectantes y de biocidas en nuestro hospital. Esto ha sido corroborado en el clon ST258 de *K. pneumoniae* que, además de albergar el gen *bla<sub>KPC</sub>*, demostró tener una sensibilidad disminuida a clorhexidina, en comparación con otros clones esporádicos portadores del gen *bla<sub>KPC</sub>*. Nuestros resultados muestran que el genoma de KP\_ST11\_OXA-48 contenía los genes *oqxA* y *opxB*, que le confieren resistencia a clorhexidina. La clorhexidina es un compuesto ampliamente utilizado en el entorno hospitalario que podría haber contribuido a la selección y diseminación de esta cepa por todo el hospital. Sin embargo, esto no es más que una hipótesis ya que en este trabajo no se han realizado los estudios fenotípicos correspondientes que demuestren la resistencia a compuestos desinfectantes (193). Otro argumento que va a favor de la persistencia de los clones de alto riesgo es la identificación de genes que codifican resistencia a metales en el plásmido epidémico pKPN3, vinculado estrechamente con el clon ST258 (194).

El análisis genómico también reveló una gran diversidad de EGMs, entre ellos 4 tipos de plásmidos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad plasmídica, IncFIB, IncFII, IncL/M e IncR. Hay estudios que demuestran que la presencia de genes de resistencia en cepas de *K. pneumoniae* se debe principalmente a la adquisición de plásmidos conjugativos de gran tamaño (195). Este es el caso de la familia de plásmidos IncF, que se han documentado en todas las especies del orden *Enterobacterales*. Esta familia de plásmidos se caracteriza por presentar un estado de “multirreplicón”, es decir, que tiene la capacidad de replicarse usando replicones alternativos, evitando así el efecto de incompatibilidad debido a la presencia simultánea de dos plásmidos incompatibles que residen en la misma célula (195). El subgrupo IncFIIk (*Klebsiella*) que se encuentra asociado a IncFIB fue el replicón más frecuente identificado en la colección de plásmidos analizada mediante plasmidFinder desarrollada por Carattoli y cols. (196).

Los resultados de nuestro trabajo mostraron que el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> estaba formando parte del transposón compuesto Tn1999.2 que, a su vez, se asoció a un plásmido IncL/M, denominado pKPOXA-48J1. Este plásmido resultó ser 100% idéntico al plásmido pOXA48a, que fue caracterizado en 2011 por *Poirel y cols.* (77). La estructura del plásmido estaba compuesta por genes conservados que formaron parte de la maquinaria de replicación y conjugación plasmídica. Los únicos genes accesorios que estuvieron presentes en este plásmido correspondieron al transposón Tn1999 y al gen *bla*<sub>OXA-48</sub>, como único gen de resistencia. Tal y como se describió en el trabajo de *Poirel y cols.*, el Tn1999.2 se localizó insertado en el gen *tir* dando lugar a una forma truncada que no llega a expresarse. Este gen codifica una proteína inhibidora de la conjugación bacteriana y al estar truncado, no es funcional, y tiene lugar un aumento en la frecuencia de conjugación plasmídica y una eficiente diseminación del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> entre diferentes especies del orden *Enterobacterales* (77). Algunos estudios han revelado que la frecuencia de transposición del Tn1999 es baja, y que la presencia de las secuencias de inserción (IS1999) localizadas a ambos lados del gen *bla*<sub>OXA-48</sub>, aumenta la capacidad de movilización de este transposón, así como, del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> que llevaba asociado (197). Al mismo tiempo, se ha demostrado que los plásmidos portadores del gen *bla*<sub>OXA-48</sub>, identificados en diferentes miembros de *Enterobacterales*, presentaban un tamaño similar (60-70 kb), pertenecen a un grupo de incompatibilidad concreto (IncL/M) y no albergan otros genes de resistencia. Además, estos plásmidos han sido detectados en cepas pertenecientes a diferentes STs y que provienen de diferentes regiones geográficas. Por tanto, estos hallazgos sugirieron la posibilidad de que se tratara de un plásmido epidémico con una gran capacidad de propagación (77).

Es importante señalar algunas limitaciones del estudio molecular. A pesar de haber reconstruido el plásmido pKPOXA-48J1, no fuimos capaces de reconstruir la estructura de los otros plásmidos identificados utilizando las herramientas bioinformáticas desarrolladas en ese momento. Hay estudios que demostraron que el gen *bla*<sub>CTXM-15</sub> se asoció frecuentemente



con plásmidos del grupo IncFII (198). No obstante, en este caso no pudimos confirmar la vinculación del gen *bla*<sub>CTXM-15</sub> con los demás plásmidos identificados en el genoma (IncFIB, IncFII e IncR). Otra limitación de este estudio fue que se secuenció el genoma completo de una cepa representativa del brote mayoritario producido en nuestro hospital y no se pudo realizar el análisis filogenético basado en la aproximación del estudio de SNPs entre los aislamientos pertenecientes al clon ST11 de *K. pneumoniae* OXA-48.

En general, los resultados del estudio molecular demuestran que la coexistencia de múltiples genes de resistencia en una misma cepa contribuye a la selección “exitosa” de este patógeno, y lo convierte en un verdadero desafío clínico y de salud pública debido principalmente a las limitadas opciones de tratamiento antibiótico de estas infecciones. Por este motivo, es necesario investigar, no sólo la coproducción de diferentes genes de resistencia que pueden estar presentes en el genoma de una bacteria, sino también, aquellos elementos del “moviloma” o conjunto de genes transferibles que pueden ayudar a propagar los genes entre diferentes bacterias.

### **3. Papel de los EGMs en la diseminación de los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas.**

En este estudio se investigó la epidemiología molecular de varias cepas multirresistentes de *C. freundii* mediante SGC. Actualmente, hay muy pocos estudios que describen la epidemiología y la caracterización molecular de los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas debido a que la emergencia de esta especie es menos frecuente (174,199–204). La estructura poblacional de los aislamientos de *C. freundii* productores de carbapenemasas presentó un patrón policlonal en el que no destacó ninguno de los clones. Esta emergencia policlonal de cepas de *C. freundii* productoras de carbapenemasas contrasta con los datos publicados por el estudio de *Arana y cols* en España (205). Entre nuestros resultados destacar que únicamente dos aislamientos (CF\_6 y CF\_14) se

identificaron como el mismo clon (ST18) presentando 158 SNPs de diferencia entre sus genomas y estando estrechamente relacionados. En este contexto, en el año 2016 se describió un brote causado por este mismo clon perteneciente al clon ST18 de *C. freundii* productor de NDM-1 en Dinamarca (200).

Durante el periodo de estudio, el porcentaje de infecciones/colonizaciones por *C. freundii* productor de carbapenemasas fue del 2,1%, siendo VIM-1 la carbapenemasa más prevalente, seguida de KPC-2. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en un estudio multicéntrico español realizado en 2013 donde se incluyeron 379 EPC, y en el que únicamente se detectaron 7 aislamientos de *C. freundii* productor de carbapenemasas (3 VIM, 2 OXA-48 y 2 KPC) (103). Otro trabajo español que estudió la epidemiología molecular y las características microbiológicas de aislamientos de *Citrobacter spp* demostró la presencia de varios tipos de carbapenemasas (VIM-1/VIM-2, OXA-48, KPC-2, NDM-1) donde VIM-1 fue la más frecuente, seguida de OXA-48 (205). A pesar de que OXA-48 es el tipo de carbapenemasa más prevalente en nuestro hospital, no se detectó ningún aislamiento de *C. freundii* portador de OXA-48.

Además, nuestros resultados mostraron la detección simultánea de dos genes de carbapenemasa, *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>KPC-2</sub>, en la misma cepa. La co-producción de múltiples genes de carbapenemasas en una única cepa ha sido detectada en diferentes áreas geográficas (205–207). Un estudio publicado por *Poirel y cols.* reportó un caso de un paciente que regresaba de un viaje a la India con una infección del tracto urinario causada por un aislamiento de *C. freundii* en el que se detectaron las carbapenemasas NDM-1, VIM-4 y OXA-181 (208). Es importante tener en cuenta la acumulación de genes de resistencia a carbapenémicos en algunos aislamientos, ya que limita las opciones terapéuticas y podrían servir como reservorio para la diseminación de genes de resistencia a carbapenémicos.

En este estudio, 10 de 11 cepas de *C. freundii* estaban codificando en su genoma la MBL VIM-1 y, únicamente, dos de los aislamientos fueron productores de KPC-2. El análisis *in silico* con la herramienta plasmidSPAdes nos permitió demostrar que tanto VIM-1 como KPC-2 tenían una localización plasmídica. Aunque esta aproximación tiene ciertas limitaciones para comprobar la localización de un gen en el genoma de una bacteria, un estudio publicado por *Arredondo-Alonso y cols*, demostró que la herramienta plasmidSPAdes fue la que obtuvo mayor rendimiento como ensamblador para reconstruir plásmidos a partir de secuencias de lecturas cortas (209). Al analizar la composición de los plásmidos en las cepas portadoras de carbapenemasa, se detectaron 7 tipos de replicones (IncFIA, IncFIB, IncFII, IncHI1A, IncHI1B, IncL/M, IncP) donde el tipo IncL/M fue el más frecuente.

Otro de los hallazgos de este estudio fue que la carbapenemasa VIM-1 se localizó en un integrón de clase 1, denominado In624, que contenía en su estructura 6 genes de resistencia. Este integrón ya había sido descrito anteriormente en un aislamiento de *E. cloacae complex* en nuestro hospital, en un aislamiento de *K. pneumoniae* asociado a un plásmido IncI1 aislado en otro hospital de Madrid, y también en otros aislamientos de *C. freundii* que habían sido coleccionados de un estudio multicéntrico español (121,205). El estudio de *Matsumura y cols*, en el que se analizaron 89 aislamientos de *Enterobacterales* productores de VIM mediante SGC para estudiar la distribución de estas cepas por Europa, demostró la existencia de 11 variantes de VIM que estaban asociadas a 21 tipos de integrones diferentes. En este estudio se demostró que había algunos integrones que fueron específicos de un país concreto y de un determinado complejo clonal, dentro de estos integrones se encontraban el In624, In87, In916 e In1323, mientras que otros integrones como, In110 e In1209, se habían distribuido a nivel mundial (56).

Curiosamente, al analizar la composición de los integrones pudimos demostrar que 3 cepas fueron portadoras de integrones complejos que se caracterizaron por presentar en la

región *downstream* del In624 la secuencia de inserción ISCR1 y los genes que codifican resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (*qnrA* y *qnrB*). El gen *qnrB* es el más común de las cinco familias de *qnr* y se ha demostrado que está presente en el cromosoma de algunos aislamientos de *Citrobacter spp.* George A. Jacoby y cols, estudiaron la prevalencia de los genes *qnr* de localización plasmídica en 71 aislamientos clínicos de *C. freundii* complex y los resultados mostraron que el 37% de los aislamientos presentaban en su genoma el gen *qnr* y que, únicamente dos cepas fueron portadoras de los genes *qnrB2* y *qnrB4*, respectivamente. Estas cepas contenían la secuencia de inserción ISCR1 que a menudo se ha asociado con genes *qnrB* en plásmidos (210). Nuestros resultados, junto con los estudios publicados en la literatura, sugieren que la presencia de la ISCR1 asociada a este tipo de integrones puede favorecer la movilización y la propagación de los genes *qnr* desde el cromosoma al plásmido (211–215).

Otro de los hallazgos importantes encontrados tras el análisis de la estructura poblacional fue que dos aislamientos, CF\_1 (ST89) y CF\_4 (ST90), se encontraron alejados del resto de cepas en el árbol filogenético y, al mismo tiempo, coincidieron con las cepas que habían sido reclasificadas taxonómicamente como *C. portucalensis*. La especie de *C. portucalensis* se encuentra estrechamente relacionada con *C. freundii*, se caracterizó desde el punto de vista genotípico, fenotípico y filogenético por primera vez en una muestra de agua en Portugal en 2017 (216). Los autores de este trabajo sugirieron que *C. portucalensis* podría ser clasificada como una nueva especie (217). Hasta la fecha, únicamente hay publicados 2 estudios en los que se describen cepas de *C. portucalensis* que son aisladas de animales y que son portadoras de múltiples genes de resistencia a antimicrobianos (218–220). De tal forma que, los dos aislamientos detectados en muestras clínicas de pacientes ingresados en nuestra institución serían los primeros *C. portucalensis* productores de carbapenemasas del tipo VIM-1 y KPC-2 asociados a infección.

#### 4. Emergencia del clon de alto riesgo ST78 de *E. hormaechei* productor de NDM-7.

En este trabajo se describen los primeros casos de infecciones y colonizaciones causadas por un clon internacional de *E. hormaechei* productor de NDM-7 en nuestro hospital. Aunque se han publicado algunos casos de *E. hormaechei* productor de carbapenemasa, éste sería el primer aislamiento de *E. hormaechei* productor de NDM-7 en España hasta la fecha actual. (73,221–223).

Desde que se detectó el primer caso de *Enterobacterales* productores de NDM, se han reportado numerosos casos a lo largo de todo el mundo, siendo las especies más prevalentes *K. pneumoniae* y *E. coli* (58,224–226). En España, se publicó el primer caso de *bla*<sub>NDM</sub> en un aislamiento de *K. pneumoniae* en 2012 (227). Desde entonces se han recogido casos esporádicos a lo largo de toda la geografía española. En 2019, se publicó un estudio multicéntrico que mostró la epidemiología molecular de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de NDM utilizando la SGC para caracterizar el resistoma, moviloma y la estructura poblacional. Los resultados de este estudio español mostraron que existió una diseminación de algunos clones de alto riesgo de *K. pneumoniae* productora de NDM y una diseminación policlonal de *E. coli* portadores de *bla*<sub>NDM</sub> (226).

Las 3 cepas de *E. hormaechei* productoras de NDM-7 mostraron resistencia a múltiples antibióticos, incluidos ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam. Únicamente mostraron sensibilidad a ampicilina y tigeciclina. Las cepas fueron aisladas de muestras clínicas de pacientes que habían sido colonizados previamente. Los 3 pacientes ancianos presentaron diversas comorbilidades y ninguno de ellos había viajado fuera de España. Desde que se detectó el primer caso de NDM en el mundo, se han identificado *Enterobacterales* productores de diferentes variantes de NDM por diferentes regiones

geográficas y la mayoría de casos han estado relacionados con viajes al subcontinente indio, los Balcanes y países de Oriente Medio (58). En el Reino Unido, entre 2008 y 2009, se detectaron 29 casos de NDM-1, de los cuales, 17 pacientes tenían antecedentes de haber viajado a la India o Pakistán en el año anterior (224,228). Sin embargo, en este estudio, no pudimos encontrar un vínculo entre estos pacientes y las diferentes áreas endémicas, por lo que no se pudo trazar cual fue la posible vía de adquisición. Nuestros resultados sugieren que los pacientes podrían haber adquirido estas cepas MDR en alguno de los contactos que tuvieron con el sistema sanitario y haber colonizado su microbiota intestinal con estas cepas previo al desarrollo de la infección y esto sugiere que NDM ya no es importada ni está necesariamente asociada a viajes, sino que es endémica. De acuerdo a los datos publicados, más allá de la adquisición nosocomial y de los factores de riesgo asociado al turismo a zonas endémicas, los viajeros pueden regresar de los países con alta prevalencia de NDM, colonizados con dichas cepas sin haber tenido contacto con el sistema de salud (229).

Los 3 aislamientos fueron identificados como *E. cloacae* complex mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). El complejo *E. cloacae* se compone de 6 especies que están genéticamente relacionadas y son fenotípicamente similares (*E. cloacae*, *Enterobacter absburiae*, *Enterobacter disuelve*, *E. hormaechei*, *E. kobei* y *Enterobacter nimipressuralis*) (169). Una limitación que tiene la técnica MALDI TOF, es que en la actualidad no es capaz de identificar especies que están muy relacionadas entre sí, como es el caso de las especies pertenecientes a un mismo complejo (230). Por ello, en este estudio, se completó la identificación *in silico* mediante la utilización de la herramienta JSpeciesWS con la que se llegó a clasificar a las cepas como *E. hormaechei* (ANI>99%) (231). La especie *E. hormaechei* fue descrita por primera vez en 1989. *E. hormaechei* es considerado un patógeno nosocomial importante que presenta resistencia intrínseca a algunos antibióticos. Además, esta especie se ha relacionado con determinados complejos clonales que representan un riesgo epidemiológico por asociarse con la propagación de genes de resistencia. (169).

El análisis de la diversidad plasmídica mostró que los 3 aislamientos de *E. hormaechei* contenían 3 tipos de plásmidos (IncA/C, IncFIB e IncX3). Los resultados de nuestro trabajo demostraron que el gen *bla*<sub>NDM-7</sub> se localizó en un plásmido del tipo IncX3. Este plásmido se denominó pEH-NDM-7-JV y fue 100% idéntico al plásmido pOMP26-1, detectado en una cepa de *E. coli* de un estudio realizado en la península arábiga y en diferentes *Enterobacterales* productores de NDM-7 causantes de un brote en Canadá (232,233). Según lo publicado en la literatura científica, la enzima NDM se asocia con mayor frecuencia a los plásmidos conjugativos de tipo IncA/C en diferentes especies de *Enterobacterales*, estos a su vez, se asocian con otros genes de resistencia antibiótica (41). Sin embargo, esta carbapenemasa también ha sido descrita en otras especies, como *Acinetobacter spp*, codificada en el cromosoma bacteriano (234).

En relación con el entorno genético del gen *bla*<sub>NDM</sub>, se ha estudiado que suele ir ubicado entre las secuencias de inserción IS*Aba125*, dando lugar al transposón compuesto Tn*125* (familia Tn3) (235,236). Sin embargo, en este estudio el gen *bla*<sub>NDM</sub> se encontró asociado en el extremo 5' con la secuencia IS*Aba125*, que estaba truncada, y en el extremo 3' asociado al gen *ble*<sub>MBL</sub>. Los genes *ble*<sub>MBL</sub> y *bla*<sub>NDM</sub> forman un único operón cuya regulación está bajo el control de un promotor que se localiza *upstream* del gen *bla*<sub>NDM</sub> (234). El gen *ble*<sub>MBL</sub> codifica una proteína responsable de la resistencia a la bleomicina, un compuesto de la familia de los glucopéptidos obtenido de forma natural a partir de *Streptomyces spp.* y que tiene propiedades antibacterianas y quimioterápicas. Se ha demostrado que hay una mayor circulación del gen *bla*<sub>NDM</sub> en el entorno hospitalario. Una de las hipótesis que se baraja sobre el origen de la diseminación de cepas productoras de NDM en los hospitales se ha relacionado con el uso de  $\beta$ -lactámicos y de otros medicamentos quimioterápicos que se pueden encontrar en las aguas residuales de los hospitales. Este hecho quedó reforzado por los hallazgos obtenidos en un estudio realizado en Beijing, en el cual se detectó una tasa mayor de *A. baumannii* productor de NDM-1 en aguas residuales del hospital, comparada con

el aislamiento de una única cepa de *A. baumannii* NDM-1 en aguas de ríos, estanques y aguas potables de la ciudad (237).

El análisis filogenético demostró que las tres cepas estaban estrechamente relacionadas y pertenecían al mismo clon, denominado ST78. Sin embargo, el estudio epidemiológico no pudo demostrar la transmisión de estas cepas entre los pacientes afectados y tampoco el contacto con áreas endémicas. Los pacientes estuvieron ingresados en distintos servicios clínicos del hospital y fueron atendidos por personal sanitario diferente. Nuestros resultados advierten la probabilidad de que haya pacientes colonizados por el clon ST78 de *E. hormaechei* productor de NDM y que no hayan sido detectados o que la carbapenemasa NDM-7 pudiera haber estado circulando entre otras especies de *Enterobacterales* y que el clon ST78 pudiera haberlo adquirido.

Este estudio pone de manifiesto la emergencia del clon ST78 de *E. hormaechei* productor de carbapenemasa NDM-7 en nuestro hospital y en España. Un hallazgo importante a tener en cuenta es que el clon ST78 representa a un clon de alto riesgo internacional que ha sido identificado en diferentes países europeos (Polonia, España, Italia, Grecia y Turquía) y en la región de Asia-Pacífico, y se ha asociado con diferentes determinantes de resistencia, incluidos las carbapenemasas (OXA-48, VIM-1, KPC-2 e IMP-1/4/8 (56,73).

En general, esta tesis nos ha permitido estudiar la epidemiología molecular de las EPC más frecuentes en nuestro hospital, y conocer con más profundidad, gracias a la tecnología de secuenciación masiva, las estructuras genéticas móviles que vehiculizaron a las principales carbapenemasas y que favorecieron su diseminación entre las especies de *Enterobacterales*. Este estudio pone de manifiesto la problemática en relación con la resistencia a los antimicrobianos, que coincide con la situación epidemiológica a nivel mundial. Actualmente, estamos viviendo una crisis global relacionada con la resistencia a los antibióticos, en la que *K. pneumoniae* representa unos de los patógenos más preocupante



involucrados en la resistencia a los antibióticos, junto con otros microorganismos MDR que forman parte del grupo ESKAPE (80,238). Los resultados de esta tesis corroboran lo que se ha publicado en la literatura durante los últimos años, y mostraron que *K. pneumoniae* productora OXA-48 fue la especie más prevalente y la que causó mayor número de infecciones/colonizaciones, dando lugar a una situación preocupante en nuestra institución. A pesar de las medidas de vigilancia epidemiológica implementadas en el hospital durante los 10 años que duró el estudio, en la actualidad se siguen detectando casos de *K. pneumoniae* OXA-48 pertenecientes al clon ST11. Los datos recogidos de la red de vigilancia europea de la última década muestran que las tasas de aislamientos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos es muy superior a los aislamientos de *E. coli* resistente a carbapenémicos, lo que sugiere que *K. pneumoniae* supone una fuente de determinantes de resistencia a los antibióticos. Por otra parte, durante los 10 años de estudio de esta tesis también se detectaron otras especies de *Enterobacterales* que dieron lugar a una diseminación policlonal. Estos casos se refirieron a aislamientos esporádicos de *E. cloacae* y *C. freundii* productores de carbapenemasa tipo VIM-1 en todos ellos. El gen *bla*<sub>VIM-1</sub> se localizó en una gran variedad de plásmidos asociados a integrones de clase 1 y que favorecieron la diseminación horizontal entre las distintas especies. Además, aunque no ha sido motivo de esta tesis, durante los últimos años del estudio se observó la emergencia policlonal de casos de *E. coli* resistentes a carbapenémicos (ECRC) en nuestro hospital. La distribución temporal de infecciones/colonizaciones causadas por ECRC se mantuvo constante desde la aparición del primer caso en 2011, sin embargo, se produjo un aumento considerable en 2018 fundamentalmente a expensas de la carbapenemasa de tipo OXA-48 (239).

En resumen, nuestros estudios indican que los EGMs juegan un papel muy importante en la diseminación de los genes de carbapenemasas. En el primer estudio, se observó la diseminación del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> entre los aislamientos de *E. cloacae* complex debida a un plásmido de gran tamaño perteneciente al grupo IncHI2, que albergó en su estructura el gen *bla*<sub>VIM-1</sub> asociado en dos tipos de integrones (In624 e In488). En el segundo estudio, se produjo

la diseminación explosiva del clon ST11 de *K. pneumoniae* OXA-48, a través del plásmido epidémico pKPOXA-48J1 y que persiste en la actualidad en nuestro hospital. En el tercer estudio, la diseminación de la enzima VIM-1 fue a expensas del integron In624 y de una gran variedad de plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad. La transferencia tuvo lugar entre diferentes cepas de *C. freundii*, de las cuales, no destacó ningún clon de alto riesgo. Finalmente, en el cuarto estudio se produjo una diseminación del clon ST78 de *E. cloacae* complex (*E. hormaechei*), considerado un clon de alto riesgo internacional, que llevaba asociado el gen *bla*<sub>NDM</sub> en el plásmido pEH-NDM-7-JV, perteneciente al grupo IncX3.

Para concluir, es importante conocer la epidemiología de cada hospital en relación con las especies y clones circulantes, los tipos de carbapenemasas y los EGMs implicados en su diseminación. Todo ello será muy útil para revisar e intensificar las medidas de control de las infecciones hospitalarias, y para actualizar las políticas de antibióticos a nivel hospitalario y extrahospitalario, favoreciendo el uso prudente de los mismos.

## CONCLUSIONES

1. La incidencia de las infecciones causadas por *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos ha mantenido una tendencia ascendente en los últimos años en el Hospital Universitario 12 de Octubre. El principal mecanismo de resistencia ha sido la producción de carbapenemasas. Tres especies fueron las principales productoras de carbapenemasas (*K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *C. freundii*), destacando *K. pneumoniae* productora de OXA-48 como la especie predominante durante todo el periodo de estudio.
2. *E. cloacae* fue la primera especie portadora de una carbapenemasa detectada en nuestro hospital, siendo VIM-1 la carbapenemasa más frecuente entre todos los aislamientos. El análisis de la estructura poblacional de los aislamientos de *E. cloacae* VIM-1 reveló una gran diversidad clonal. Por otra parte, los resultados de nuestra investigación sugieren que la diseminación del gen *bla*<sub>VIM-1</sub> fue causada por la transferencia de un plásmido del grupo IncHI2 asociado a dos tipos de integrones denominados In624 e In488.
3. Durante los primeros años de estudio (2009-2014), se detectó la emergencia de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de VIM-1, los cuales mostraban una gran diversidad clonal. Estos aislamientos fueron responsables de pequeños brotes que tuvieron lugar en servicios clínicos específicos, como la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología y el servicio de Nefrología. Sin embargo, este escenario epidemiológico cambió hacia una diseminación del clon ST11 de *K. pneumoniae* OXA-48 en el hospital desplazando a la mayoría de los otros clones.
4. La carbapenemasa más frecuentemente identificada en *K. pneumoniae* fue OXA-48 (61%), seguida de VIM-1 (38%) y KPC-2 (1%). El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> en *K. pneumoniae* se encontró formando parte del transposón compuesto Tn 1999 que, a su vez, estaba asociado al plásmido epidémico que se denominó pKPOXA-48J1, perteneciente al grupo IncL/M.

5. El estudio genómico de la cepa de *K. pneumoniae* KP\_ST11\_OXA-48 mostró un resistoma en el que se detectaron 121 genes de resistencia a antibióticos, metales y biocidas. La complejidad del resistoma sugirió que la persistencia de este clon en el hospital podría haber sido facilitada por la presión selectiva debida al uso intenso de los antibióticos, y también por la utilización de desinfectantes y de biocidas en nuestro hospital.
6. Durante 2009 a 2014 el porcentaje de infecciones/colonizaciones por *C. freundii* productor de carbapenemasas fue del 2%, siendo VIM-1 la carbapenemasa más prevalente, seguida de KPC-2. Una de las 11 cepas de *C. freundii* mostró la presencia simultánea de dos genes de carbapenemasa, *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>KPC-2</sub>.
7. La estructura poblacional de los aislamientos de *C. freundii* mostró un patrón policlonal en los que el gen *bla*<sub>VIM-1</sub> se localizó en el integron In624 y que se asoció a varios tipos de plásmidos. Tres de los aislamientos fueron portadores de un integrón complejo que incluyó la secuencia de inserción ISCR1 y los genes *qnr*.
8. Se describen por primera vez en España dos casos de infecciones hospitalarias producidas por *Citrobacter portucalensis* productores de carbapenemasas de tipo VIM-1 y KPC-2, respectivamente.
9. Se identifican los primeros casos en España de infecciones/colonizaciones por *Enterobacter hormaechei* productor de NDM-7 pertenecientes al clon internacional ST78. Correspondían a tres pacientes ancianos que no habían viajado fuera de España y que presentaban diversas comorbilidades. El gen *bla*<sub>NDM-7</sub> se encontró asociado a la secuencia de inserción IS*Aba*125 y se localizó en el plásmido denominado pEH-NDM-7-JV, perteneciente al grupo IncX3.

10. Es importante conocer la epidemiología de cada hospital en relación con las especies de *Enterobacterales*, clones circulantes, tipos de carbapenemasas y EGMs implicados en su diseminación. Todo ello será muy útil para revisar e intensificar las medidas de control de las infecciones hospitalarias, y para actualizar las políticas de antibióticos a nivel hospitalario y extrahospitalario, favoreciendo el uso prudente de los mismos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. **Munson E, Carroll KC.** An update on the novel genera and species and revised taxonomic status of bacterial organisms described in 2016 and 2017. *J Clin Microbiol.* 2019;57(2):1-21.
2. **Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS.** Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(12):5575-99.
3. **Morales-López S, Yepes JA, Prada-Herrera JC, Torres-Jiménez A.** *Enterobacteria* in the 21st century: A review focused on taxonomic changes. *J Infect Dev Ctries.* 2019;13(4):265-73.
4. **Potter RF, D'Souza AW, Dantas G.** The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Vol. 29, *Drug Resistance Updates.* 2016. p. 30-46.
5. **Nordmann P, Naas T, Poirel L.** Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-8.
6. **Asokan G V., Ramadhan T, Ahmed E, Sanad H.** WHO global priority pathogens list: A bibliometric analysis of medline-pubmed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain. Vol. 34, *Oman Medical Journal.* 2019. p. 184-93.
7. **Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al.** Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318-27.
8. **Neill JO'.** Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. 2014.
9. **Beatriz Suay-García and María Teresa Pérez-Gracia.** Present and Future of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Infections. Vol. 8(3), *antibiotics.* 2019. p. 122.
10. **Duin D Van, Doi Y.** The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence.* 2017;8(4):460-9.
11. Centers for Disease Control and Prevention. CDC. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). *Natl Cent Emerg Zoonotic Infect Dis* 2015;(November):24.
12. **Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM.** Plasmid evolution in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a review. Vol. 1457, *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2019. p. 61-91.
13. **Van der Bij AK, Pitout JDD.** The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(9):2090-100.
14. **Fresnadillo Martínez M, García García**



- M, García Sánchez E, García Sánchez J.** Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(Supl 2):53-64.
15. **Codjoe F, Donkor E.** Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci.* 2017;6(1):1.
16. **Pagès JM, James CE, Winterhalter M.** The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Vol. 6, *Nature Reviews Microbiology.* 2008. p. 893-903.
17. **Tsai YK, Liou CH, Fung CP, Lin JC, Siu LK.** Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems. *PLoS One.* 2013;8(11):1-8.
18. **R. P. Ambler.** The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-31.
19. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure . MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for  $\beta$  -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211–1233.
20. **Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. Vol. 54, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010. p. 969-76.
21. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases. Vol. 20, *Clinical Microbiology Reviews.* 2007. p. 440-58.
22. **Sánchez-López J, Cantón R.** Current status of ESKAPE microorganisms in Spain: Epidemiology and resistance phenotypes. Vol. 32, *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia.* 2019. p. 27-31.
23. **Yang Y, Wu P, Livermore DM.** Biochemical characterization of a  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(5):755-8.
24. **Nordmann P, Poirel L.** The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(9):821-30.
25. **Walther-Rasmussen J, Høiby N.** Class A carbapenemases. Vol. 60, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2007. p. 470-82.
26. **Rojo-Bezares B, Martín C, López M, Torres C, Sáenz Y.** First detection of *bla*<sub>IMI-2</sub> gene in a clinical *Escherichia coli* strain. Vol. 56, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012. p. 1146-7.
27. **Martínez-Martínez L, González-López JJ.** Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(S4):4-9.
28. **Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L,**

- Bellais S, Cavallo JD, et al.** Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(4):891-7.
29. **Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P.** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended- spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):622-32.
30. **Poirel L, Weldhagen GF, Champs C De, Nordmann P.** A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother.* 2002;56:1-5.
31. **Ribeiro VB, Falci DR, Rozales FP, Barth AL, Zavascki AP.** *K. pneumoniae* in Southern Brazil. *Brazilian J Infect Dis.* 2010;18(2):231-2.
32. **Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al.** Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4930-3.
33. **Bonnin A, Nordmann P, Potron A, Zahar J, Poirel L, Bebrone C, et al.** Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):349-54.
34. **Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, Bennink S, Kupper MB, Castro R De.** *Pseudomonas aeruginosa* That Contains Ile80 and Ser170 Residues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):396-401.
35. **Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C.** Molecular Characterization of a Novel Class 1 Integron Containing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Society.* 2002;46(3):638-45.
36. **Galani I, Souli M, Koratzanis E, Chrysosouli Z, Giamarellou H.** Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase GES-7: Identification of the In8 integron carrying the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):432-3.
37. **Nordmann P, Poirel L.** Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S521-8.
38. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-sanchez A, Biddle JW, Steward CD.** Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of. *Society.* 2001;45(4):1151-61.
39. **Tijet N, Sheth PM, Lastovetska O, Chung C, Patel SN, Melano RG.**

- Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* in Ontario, Canada, 2008-2011. PLoS One. 2014;9(12):2008-11.
40. **Li B, Feng J, Zhan Z, Yin Z, Jiang Q, Wei P, et al.** Dissemination of KPC-2-encoding IncX6 plasmids among multiple *Enterobacteriaceae* Species in a single Chinese hospital. Front Microbiol. 2018;9(MAR):1-8.
41. **Carattoli A.** Plasmids and the spread of resistance. Vol. 303, International Journal of Medical Microbiology. Elsevier GmbH.; 2013. p. 298-304.
42. **Chen L, Chavda KD, Melano RG, Jacobs MR, Koll B, Hong T, et al.** Comparative genomic analysis of kpc-encoding pkpqil-like plasmids and their distribution in New Jersey and New York hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(5):2871-7.
43. **Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB, Moland ES, Lockhart TJ, et al.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(11):4438-40.
44. **Miriagou V, Tzouveleakis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM.** Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain Due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(4):1297-300.
45. **Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Tenover FC.** Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase KPC-2. Society. 2003;47(12):3881-9.
46. **Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L.** Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. Vol. 59, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015. p. 5873-84.
47. **Sahuquillo-Arce JM.** Carbapenemases: A worldwide threat to antimicrobial therapy. World J Pharmacol. 2015;4(1):75.
48. **Lim HM, Pene JJ, Shaw RW.** Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6  $\beta$ -lactamase II structural gene. J Bacteriol. 1988;170(6):2873-8.
49. **Iaconis JP, Sanders CC.** Purification and characterization of inducible  $\beta$ -lactamases in *Aeromonas* spp. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34(1):44-51.
50. **Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR, Sekiguchi J, et al.** Molecular Characterization of a  $\beta$ -Lactamase Gene , *bla*<sub>GIM-1</sub> , Encoding a New Subclass of Metallo- $\beta$ -Lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(11):4194-7.
51. **Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-akiyama T, et al.** KHM-1 , a Novel Plasmid-Mediated Metallo- $\beta$ -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(11):4194-7.

52. **Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, et al.** A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene bla(IMP). Vol. 39, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995. p. 1612-5.
53. **Sidjabat HE, Townell N, Nimmo GR, George NM, Robson J, Vohra R, et al.** Dominance of IMP-4-Producing *Enterobacter cloacae* among Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Australia. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(7):4059-66.
54. **Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al.** Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(7):1584-90.
55. **Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** Dispersal of carbapenemase bla<sub>VIM-1</sub> gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1):320-7.
56. **Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, Bradford PA, Motyl MR, Adams MD, et al.** Genomic epidemiology of global VIM-producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2017;72(8):2249-58.
57. **Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO.** Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. Vol. 31, Clinical Microbiology Reviews. 2018. p. 1-61.
58. **Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al.** Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(12):5046-54.
59. **Wu W, Espedido B, Feng Y, Zong Z, Temkin E, Adler A, et al.** *Citrobacter freundii* carrying bla<sub>KPC-2</sub> and bla<sub>NDM-1</sub>: characterization by whole genome sequencing. Sci Rep. 2016;6:30670.
60. **Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom K.** The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. Clin Microbiol Rev. 2020;33(1):1-48.
61. **Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y.** The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. Vol. 33, Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology; 2020.
62. **Poirel L, Héritier C, Tolun V, Nordmann P.** Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(1):15-22.
63. **Goren MG, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-venezia S.** Plasmid-encoded OXA-48 carbapenemase in *Escherichia coli* from Israel. J Antimicrob Chemother. 2010;66(3):672-3.

64. **Moquet O, Coralie Bouchiat, Alfred Kinana, Abdoulaye Seck, Omar Arouna, Raymond Bercion, Sebastien Breurec and BG.** Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant *Enterobacteria*, Senegal. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(1):143-4.
65. **Kalpoe JS, Naiemi N Al, Poirel L, Nordmann P.** Case Report Detection of an Ambler class D OXA-48-type  $\beta$ -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in The Netherlands. *J Med Microbiol.* 2011;60:677-8.
66. **Brañas P, Villa J, Viedma E, Mingorance J, Orellana MA, Chaves F.** Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46(1):111-6.
67. **Pirš M, Andlovic A, Cerar T, Žohar-Čretnik T, Kobola L, Kolman J, et al.** A case of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred to Slovenia from Libya, November 2011. *Eurosurveillance.* 2011;16(50):1-2.
68. **Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P, Georges V, et al.** Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in France. 2011. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 2420–2423.
69. **Glupczynski Y, Huang T, Bouchahrouf W, Rezende R, Castro D, Bauraing C, et al.** Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2012. 39(2), 168–172.
70. **O'Brien, D. J., Wrenn, C., Roche, C., Rose, L., Fenelon, C., Flynn, A. et al.** First isolation and outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in an Irish hospital, March to June 2011. *Eurosurveillance*, 16(29).
71. **Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F.** First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4398-401.
72. **Gauthier L, Dortet L, Cotellon G, Creton E, Cuzon G, Ponties V, et al.** Diversity of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates in France in 2012-2013. Vol. 62, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2018. p. 1-9.
73. **Peirano, G., Matsumura, Y., Adams, et al.** Genomic epidemiology of global carbapenemase-producing *Enterobacter spp.*, 2008–2014. *Emerging Infectious Diseases.* 2018. 24(6), 1010–1019.
74. **Bedenić, B., Slade, M., Starčević, L. Ž., Sardelić, S., Vranić-Ladavac, M., Benčić, A., ... Tambić-Andrašević, A.** Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. *Journal of Medical Microbiology.* 2018. 67(8), 1031–1041.

75. **Maragakis, L. L., Winkler, A., Tucker, M. G., Cosgrove, S. E., Ross, T., Lawson, E et al.** Sink traps as the source of transmission of OXA-48 – producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2008. 29(5), 418–423.
76. **Chen L, Al Laham N, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Bonomo RA, et al.** First report of an OXA-48-producing multidrug-resistant *Proteus mirabilis* strain from Gaza, Palestine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(7):4305-7.
77. **Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P.** Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):559-62.
78. **Akan A, Feriha C, Poirel L, Yilmaz M, Matar G, Honderlick P, et al.** Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):1369-73.
79. **Beyrouthy R, Robin F, Delmas J, Gibold L, Dalmasso G, Dabboussi F, et al.** IS 1R -Mediated Plasticity of IncL / M Plasmids Leads to the Insertion of bla OXA-48 into the *Escherichia coli* Chromosome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;58(7):3785-90.
80. **Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A.** *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. Vol. 41, FEMS Microbiology Reviews. 2017. p. 252-75.
81. **Mahillon J, Chandler M.** Insertion Sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(3):725-74.
82. **Bennett PM.** Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. In *British Journal of Pharmacology*. 2008. (Vol. 153).
83. **Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, et al.** The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol*. 2008;190(14):5095-100.
84. **Sabaté, M., Prats, G.** Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2002. 20(7), 341–345.
85. **Leverstein-van Hall M a, M Blok HE, T Donders a R, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J.** Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis*. 2003;187(2):251-9.
86. **Akrami F, Rajabnia M, Pournajaf A.** Resistance integrons; A mini review. *Caspian J Intern Med* 2019; 10(4): 370-376.
87. **Collis, C. M., Hall, R. M.** Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Molecular Microbiology*. 1992. 6(19), 2875–2885.
88. **Collis, C. M., & Hall, R. M.** Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron

- DNA integrase. *Journal of Bacteriology*, 1992. 174(5), 1574–1585.
89. **Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR.** Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons: Review article. Vol. 33, FEMS Microbiology Reviews. 2009. p. 757-84.
90. **García-Fernández A, Carattoli A.** Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, A subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and quinolone resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1155-61.
91. **Garcillán-Barcia MP, Alvarado A, De la Cruz F.** Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. Vol. 35, FEMS Microbiology Reviews. 2011. p. 936-56.
92. **Del Solar G, Espinosa M.** Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol.* 2002;37(3):492-500.
93. **Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F.** Mobility of Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):434-52.
94. **Datta, N., Hedges, R.W.** Compatibility groups among fi-R factors. *Nature (London).* 1971. 234, 222–223
95. **Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ.** Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005;63(3):219-28.
96. **Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, et al.** Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer  $\beta$ -lactams. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(7):1145-8.
97. **Carattoli A.** Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. Vol. 53, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2009. p. 2227-38.
98. **Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ.** Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63(3):219-28.
99. **Dolejska M, Papagiannitsis CC.** Plasmid-mediated resistance is going wild. Vol. 99, *Plasmid.* Elsevier; 2018. p. 99-111.
100. **Munoz-price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al.** Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect .* 2013;13(9):785-96.
101. **Patel G, Bonomo RA.** «Stormy waters ahead»: Global emergence of carbapenemases. Vol. 4, *Frontiers in Microbiology.* 2013. p. 1-17.
102. **Cui X, Zhang H, Du H.** Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Detection and Antimicrobial Therapy. *Front Microbiol.* 2019;10(August):1-12.
103. **Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al.** Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in

- Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3406-12.
104. **Yang J, Ye L, Guo L, Zhao Q, Chen R, Luo Y, et al.** A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: Dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(11).
  105. **DeLeo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, et al.** Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(13):4988-93.
  106. **Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, et al.** Genomic analysis of the emergence and rapid global dissemination of the clonal group 258 *Klebsiella pneumoniae* pandemic. *PLoS One.* 2015;10(7):1-24.
  107. **Dortet, L., Poirel, L., Nordmann, P.** Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed Research International*, 2014.
  108. **Zhang R, Liu L, Zhou H, Waichi E, Li J, Fang Y, et al.** Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Strains in China. *EBioMedicine*, 19, 98–106.
  109. **Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, et al.** Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance.* 2019;24(9):1-8.
  110. **Tórtola MT, Lavilla S, Miró E, González JJ, Larrosa N, Sabaté M, et al.** First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3492-4.
  111. **Boom JA, Tate JE, Sahni LC, Rench MA, Quaye O, Mijatovic-Rustempasic S, et al.** Sustained protection from pentavalent rotavirus vaccination during the second year of life at a large, Urban United States Pediatric Hospital. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(12):1133-5.
  112. **Segura C, Navarro F, Sorli L, Francisco A, Salvado M.** Spread of plasmids containing the *bla<sub>VIM-1</sub>* and *bla<sub>CTX-M</sub>* genes and the *qnr* determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:661–665.
  113. **Cendejas E.** Detection and characterization of *Enterobacteriaceae* producing metallo- $\beta$ -lactamases in a tertiary-care hospital in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16: 181–183.
  114. **Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, et al.** Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-



- 245 in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(2):317-21.
115. **Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P, et al.** La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: Documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(10):666-70.
116. **López-Cerero L, Egea P, Gracia-Ahufinger I, González-Padilla M, Rodríguez-López F, Rodríguez-Baño J, et al.** Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(6):538-40.
117. **Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernandez-Romero S, Hernandez-Molina JM, Perez-Vazquez M, et al.** Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):6344-7.
118. **Pérez-Vázquez M, Oteo J, García-Cobos S, Aracil B, Harris SR, Ortega A, et al.** Phylogeny, resistome and mobile genetic elements of emergent OXA-48 and OXA-245 *Klebsiella pneumoniae* clones circulating in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(4):887-96.
119. **Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, Fresco G, Navarro-San Francisco C, Gudiol C, et al.** Executive summary of the diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(5):338-41.
120. **López-Camacho E, Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Wesselink JJ, Lusa-Bernal S, Ramos-Ruiz R, et al.** Population structure of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ST405 isolates during a hospital outbreak characterised by genomic typing. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;15:48-54.
121. **Tato M, Coque TM, Rucz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al.** Complex Clonal and Plasmid Epidemiology in the First Outbreak of *Enterobacteriaceae* Infection Involving VIM-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase in Spain: Toward Endemicity? *Clin Infect Dis.* 2007;45(9):1171-8.
122. **Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, Gijón D, Pintado V, Valverde A, et al.** Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2013. 68(11), 2487–2492.
123. **Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Larrosa MN, Bou G, Fernández-Martínez M, et al.** Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing

- Enterobacteriaceae* in Spain. *J Infect.* 2016;72(2):152-60.
124. **Woodford N, Turton JF, Livermore DM.** Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. Vol. 35, *FEMS Microbiology Reviews*. 2011. p. 736-55.
125. **Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al.** Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3365-70.
126. **Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, et al.** An update of the evolving epidemic of *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7):1510-3.
127. **Yoo JS, Kim HM, Yoo J II, Yang JW, Kim HS, Chung GT, et al.** Detection of clonal KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 in Korea during nationwide surveillance in 2011. *J Med Microbiol.* 2013;62(November 2010):1338-42.
128. **Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, et al.** Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3579-83.
129. **Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, et al.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2009. Vol. 53(10) 4565–4567
130. **Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L, et al.** KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: Massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog.* 2012;4(1):1-9.
131. **Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, et al.** Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(4):654-8.
132. **Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y.** Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4623-9.
133. **Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B.** Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos

- gramnegativos. Vol. 29, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011. p. 524-34.
134. **Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T.** The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. Clin Infect Dis . 2006;43(3):e26-8.
135. **Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, et al.** Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(12):4329-35.
136. **Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR.** How to detect NDM-1 producers. J Clin Microbiol. 2011;49(2):718-21.
137. **Laurent Poirel, Rémy A. Bonnin and PN.** Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(1):559-62.
138. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. Vol. 33, Journal of Clinical Microbiology. 1995. p. 2233-9.
139. **Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, et al.** Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. PLoS One. 25 de marzo de 2009;4(3).
140. **Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S.** Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol. agosto de 2005;43(8):4178-82.
141. **González R G, Mella M S, Zemelman Z R, Bello T H, Domínguez Y M.** Integrones y cassettes genéticos de resistencia: Estructura y rol frente a los antibacterianos. Vol. 132, Revista Medica de Chile. 2004. p. 619-26.
142. **Birnboim, H. C., Doly, J.** Nucleic Acids Res. 1979 Birnboim. *Nucleic Acid Research*, 7(6), 1–11.
143. **Barton BM, Gordon P, Harding, Anthony J. Zuccarelli.** A General methods for detecting and sizing large plasmids. Analytical Biochemistry. 1995;226:235-240
144. **Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, et al.** Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer  $\beta$ -lactams. Emerg Infect Dis. 2006;12(7):1145-8.
145. **Green MR** (Howard HMI, Sambrook, Joseph (The University of Melbourne A. Molecular Cloning This is a free sample of content from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition.
146. **Dark MJ.** Whole-genome sequencing in bacteriology: State of the art. Infect Drug Resist. 2013;6:115-22.

147. **Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum SAFT, Huynen MA, Melchers WJG, van Schaik W, et al.** Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: The future of nosocomial outbreak analysis. Vol. 30, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 2017. p. 1015-63.
148. **Nagarajan N, Pop M.** Sequence assembly demystified. Vol. 14, *Nature Reviews Genetics*. 2013. p. 157-67.
149. **Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al.** SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* . 2012;19(5):455-77.
150. **Antipov D, Hartwick N, Shen M, Raiko M, Lapidus A, Pevzner PA.** PlasmidSPAdes: Assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics*. 2016;32(22):3380-7.
151. **Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G.** QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-5.
152. **Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., Peplies, J.** JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2015;32(6):929-31.
153. **Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O.** Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One*. 2014;9(8).
154. **Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al.** The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.
155. **Price MN, Dehal PS, Arkin AP.** FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*. 2010;5(3).
156. **Aziz RK, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al.** The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008;9.
157. **Tatusova T, Dicuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al.** NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(14):6614-24.
158. **Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, et al.** CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D566-73.
159. **Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al.** Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2640-4.
160. **Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A.** INTEGRALL: A database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*. 2009;25(8):1096-8.

161. **Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, et al.** In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-903.
162. **Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al.** VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 1 de enero de 2005;33(DATABASE ISS.).
163. **Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al.** Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1501-10.
164. **Brañas P, Gil M, Villa J, Orellana MÁ, Chaves F.** Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* infection/colonisation in a hospital in Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(2):100-3.
165. CLSI. (2013). M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 2013.
166. **Xuan DW, Jia CC, Hong WZ, Zhang R, Chen GX.** Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J Med Microbiol.* 2009;58(9):1196-202.
167. **Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini ALC.** Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2530-5.
168. **O'Hara CM, Steigerwalt AG, Hill BC, Farmer JJ, Fanning GR, Brenner DJ.** *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family *Enterobacteriaceae* formerly known as Enteric Group 75. *J Clin Microbiol.* 1989;27(9):2046-9.
169. **Hoffmann, H., Stindl, S., Ludwig, W., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., et al.** *Steigerwaltii* subsp . nov ., Three New Subspecies of Clinical Importance. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. 43(7), 3297–3303.
170. **Giske, C. G., Monnet, D. L., Cars, O., Carmeli, Y.** Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2008.
171. **Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al.** Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective,

- multinational study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(2):153-63.
172. **Magiorakos AP, Burns K, Rodríguez Baño J, Borg M, Daikos G, Dumpis U, et al.** Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* into healthcare settings: Guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6(1):1-17.
173. **Coelho A, Piedra-Carrasco N, Bartolomé R, Quintero-Zarate JN, Larrosa N, Cornejo-Sánchez T, et al.** Role of IncHI2 plasmids harbouring bla VIM-1, blaCTX-M-9, aac(6')-Ib and qnrA genes in the spread of multiresistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* strains in different units at Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(6):514-7.
174. **Koratzanis E, Souli M, Galani I, Chrysosouli Z, Armaganidis A, Giamarellou H.** Epidemiology and molecular characterisation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a university hospital Intensive Care Unit in Greece. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(5):390-7.
175. **Albiger B, Glasner C, Struelens M, Grundmann H, Monnet D.** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national. *Euro Surveill*. 2015;20(45).
176. **Matsumura Y, Peirano G, Bradford PA, Motyl MR, DeVinney R, Pitout JDD.** Genomic characterization of IMP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(11):3034-8.
177. **Papagiannitsis CC, Miriagou V, Giakkoupi P, Tzouveleakis LS, Vatopoulos AC.** Characterization of pKP1780, a novel IncR plasmid from the emerging *Klebsiella pneumoniae* ST147, encoding the VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(10):2259-62.
178. **Miriagou V, Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Loli A, Tzelepi E, Legakis NJ, et al.** Sequence of pNL194, a 79.3-kilobase IncN plasmid carrying the bla VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4497-502.
179. **Papagiannitsis CC, Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Herda M, Hrabák J, et al.** Survey of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* colonizing patients in European ICUs and rehabilitation units, 2008-11. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(7):1981-8.
180. **Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP.** Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*. 2015;47(3):199-210.
181. **Sutton GG, Brinkac LM, Clarke TH, Fouts DE.** *Enterobacter hormaechei*

- subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggenkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequences *Enterobacter* genomes. F1000Research. 2018;7(2):521.
182. **Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, et al.** Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. J Antimicrob Chemother. 2013;68(1):84-8.
  183. **Paño Pardo JR, Villar SS, Ramos Ramos JC, Pintado V.** Infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Risk factors, clinical features and prognosis. Enferm Infecc Microbiol Clin 2014;32(Supl 4):41-8.
  184. **Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, van der Zee A, van Burgh S, de Greeff SC, et al.** Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. Eurosurveillance. 2014;19(9):1-12.
  185. **Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD.** The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):565-91.
  186. **Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, Mccalmont M, Smyth B, Donaghy P, et al.** Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2009;64(3):635-41.
  187. **Mathers AJ, Vegesana K, Mesner IG, Ainsworth J, Pannone A, Crook DW, et al.** Risk factors for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene acquisition and clinical outcomes across multiple bacterial species. J Hosp Infect. 2020;
  188. **Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P.** Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. Eurosurveillance. 2013;18(31).
  189. **Damjanova I, Tóth Á, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, et al.** Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005 - The new «MRSA»? J Antimicrob Chemother. 2008;62(5):978-85.
  190. **Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I.** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a tertiary hospital in Madrid, Spain: High percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. Int J Antimicrob Agents. 2014;43(5):460-4.
  191. **Lauderdale T-L, Shi Z-Y, Lin CF, Lai J-**

- F, Tan M-C et al. KPC-2-Producing Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Detected in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Apr; 56(4): 2207–2208.
192. Giske CG, Fröding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, et al. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of *bla*<sub>NDM-1</sub> in India, Sweden, and the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(5):2735-8.
193. Naparstek L, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Banin E, Navon-Venezia S. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. J Hosp Infect. 2012;81(1):15-9.
194. Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. J Antimicrob Chemother. 2009;65(2):243-8.
195. Osborn AM, da Silva Tatley FM, Steyn LM, Pickup RW, Saunders JR. Mosaic plasmids and mosaic replicons: Evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. Microbiology. 2000;146(9):2267-75.
196. Carattoli A, Zankari E, Garciá-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(7):3895-903.
197. Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of  $\beta$ -lactam resistance genes. J Bacteriol. 2006;188(18):6506-14.
198. Yi H, Xi Y, Liu J, Wang J, Wu J, Xu T, et al. Sequence analysis of pKF3-70 in *Klebsiella pneumoniae*: Probable origin from R100-like plasmid of *Escherichia coli*. PLoS One. 2010;5(1):1-9.
199. Aschbacher R, Pagani L, Doumith M, Pike R, Woodford N, Spoladore G, et al. Metallo- $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* from routine samples in an Italian tertiary-care hospital and long-term care facilities during 2008. Clin Microbiol Infect. 2011;17(2):181-9.
200. Hammerum AM, Hansen F, Nielsen HL, Jakobsen L, Stegger M, Andersen PS, et al. Use of WGS data for investigation of a long-term NDM-1-producing *Citrobacter freundii* outbreak and secondary in vivo spread of *bla*<sub>NDM-1</sub> to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. J Antimicrob Chemother. 2016;71(11):3117-24.
201. Liu X, Huang Y, Xu X, Zhao Y, Sun Q, Zhang Z, et al. Complete genome sequence of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* strain P10159, isolated from urine samples from a



- patient with esophageal carcinoma. *Genome Announc.* 2016;4(1):2013-4.
202. **Protonotariou E, Tsalidou M, Vitti D, Kalogeridis A SD.** First identification of VIM-1-producing *Citrobacter freundii* in Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32(5):459-60.
203. **Xiong J, Déraspe M, Iqbal N, Ma J, Jamieson FB, Wasserscheid J, Dewar K, Hawkey PM, Roy PH.** Genome and plasmid analysis of *bla*<sub>IMP-4</sub>-carrying *Citrobacter freundii* B38. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. 60:6719–6725.
204. **Yao Y, Imirzalioglu C, Hain T, Kaase M, Gatermann S, Exner M, et al.** Complete Nucleotide Sequence of a *Citrobacter freundii* Plasmid Carrying KPC-2 in a Unique Genetic Environment. *Genome Announc.* 2014;2(6):e01157-14.
205. **Arana, D. M., Ortega, A., González-Barberá, E., Lara, N., Bautista, V., Gómez-Ruíz, D., et al.** Carbapenem-resistant *Citrobacter spp.* isolated in Spain from 2013 to 2015 produced a variety of carbapenemases including VIM-1, OXA-48, KPC-2, NDM-1 and VIM-2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2017. 72(12), 3283–3287.
206. **Feng J, Qiu Y, Yin Z, Chen W, Yang H, Yang W, et al.** Coexistence of a novel KPC-2-encoding MDR plasmid and an NDM-1-encoding pNDM-HN380-like plasmid in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(11):2987-91.
207. **Meletis G, Chatzidimitriou D, Malisiovas N.** Double- and multi-carbapenemase-producers: the excessively armored bacilli of the current decade. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;1487-93.
208. **Poire L, Ros A, Carricajo A, Berthelot P, Pozzetto B, Bernabeu S, et al.** Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):447-8.
209. **Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J., van Schaik, W., Schürch, A. C.** On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microbial Genomics.* 2017. 3(10).
210. **Jacoby, G. A., Griffin, C. M., Hooper, D. C.** *Citrobacter spp.* as a source of *qnrB* alleles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2011. 55(11), 4979–4984.
211. **Saga T, Sabtcheva S, Mitsutake K, Ishii Y, Tateda K, Yamaguchi K, et al.** Characterization of *qnrB*-like genes in *Citrobacter* species of the american type culture collection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2863-6.
212. **Ribeiro TG, Novais Â, Branquinho R, Machado E, Peixe L.** Phylogeny and Comparative Genomics Unveil Independent Diversification Trajectories of *qnrB* and Genetic Platforms within Particular *Citrobacter* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):5951-8.

213. **Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR.** ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(2):296-316.
214. **Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Bistué AJCS, Guerriero L, Vargas LJ, et al.** Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6')-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(12):4466-70.
215. **Lee JJ, Kim MN, Park KS, Lee JH, Karim AM, Park M, et al.** Complex class 1 integron carrying *qnrB62* and *bla<sub>VIM-2</sub>* in a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(11):6937-40.
216. **Ribeiro TG, Clermont D, Branquinho R, Machado E, Peixe L, Brisse S.** *Citrobacter europaeus* sp. nov., isolated from water and human faecal samples. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(1):170-3.
217. **Ribeiro TG, Gonçalves BR, da Silva MS, Novais Â, Machado E, Carriço JA, et al.** *Citrobacter portucalensis* sp. Nov., isolated from an aquatic sample. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(9):3513-7.
218. **Igbinsola, E. O., Rathje, J., Habermann, D., Brinks, E., Cho, G. S., Franz, C. M. A. P.** Draft genome sequence of multidrug-resistant strain *Citrobacter portucalensis* MBTC-1222, isolated from uziza (*Piper guineense*) leaves in Nigeria. *Genome Announcements*, 2018. 6(9).
219. **Harada K, Shimizu T, Ozaki H, Kimura Y, Miyamoto T, Tsuyuki Y.** Characterization of antimicrobial resistance in *Serratia spp.* and *Citrobacter spp.* isolates from companion animals in Japan: Nosocomial dissemination of extended-spectrum cephalosporin-resistant *citrobacter freundii*. *Microorganisms.* 2019;7(3):3-13.
220. **Hasan S, Sultana M, Hossain MA.** Journal of Global Antimicrobial Resistance Complete genome arrangement revealed the emergence of a poultry origin superbug *Citrobacter portucalensis* strain NR-12. *Integr Med Res.* 2019;18:126-9.
221. **Roberts LW, Catchpoole E, Jennison A V, Bergh H, Hume A, Heney C, et al.** Genomic analysis of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Queensland reveals widespread transmission of *bla<sub>IMP-4</sub>* on an IncHI2 plasmid. *Microb genomics.* 2020;6(1).
222. **Chavda KD, Westblade LF, Satlin MJ, Hemmert AC, Castanheira M, Jenkins SG, et al.** First Report of *bla<sub>VIM-4</sub>* and *mcr-9*-coharboring *Enterobacter* Species Isolates from a Pediatric Patients. 2019;(September):1-6.
223. **Mori N, Kagawa N, Aoki K, Ishi Y, Tateda K, Aoki Y.** Clinical and molecular analyses of bloodstream infections caused by IMP metallo-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a tertiary hospital in Japan. *J Infect Chemother* .

- 2020;26(1):144-7.
224. **Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al.** Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(9):597-602.
225. **Wilson ME, Chen LH.** NDM-1 and the role of travel in its dissemination. *Curr Infect Dis Rep.* 2012;14(3):213-26.
226. **Pérez-Vázquez M, Sola Campoy PJ, Ortega A, Bautista V, Monzón S, Ruiz-Carrascoso G, et al.** Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Spain: Phylogeny, resistome, virulence and plasmids encoding *bla*<sub>NDM-like</sub> genes as determined by WGS. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(12):3489-96.
227. **Oteo J, Domingo-García D, Fernández-Romero S, Saez D, Guiu A, Cuevas O, et al.** Abdominal abscess due to NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *J Med Microbiol.* 2012;61(6):864-7.
228. **Frost I, Van Boeckel TP, Pires J, Craig J, Laxminarayan R.** Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. *J Travel Med.* 2019;26(8):1-13.
229. **Leverstein-Van Hall, M. A., Stuart, J. C., Voets, G. M., Versteeg, D., Tersmette, T., & Fluit AC, Fuursted K.** Global spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(December 2010):830-1.
230. **Rodrigues NMB, Bronzato GF, Santiago GS, Botelho LAB, Moreira BM, Coelho I da S, et al.** The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. *Brazilian J Microbiol.* 2017;48(1):132-8.
231. **Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J.** JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics.* 2016;32(6):929-31.
232. **Pál T, Ghazawi A, Darwish D, Villa L, Carattoli A, Hashmey R, et al.** Characterization of NDM-7 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolates in the Arabian Peninsula. *Microb Drug Resist.* 2017;23(7):871-8.
233. **Chen L, Peirano G, Lynch T, Chavda KD, Gregson DB, Church DL, et al.** Molecular characterization by using next-generation sequencing of plasmids containing *bla*<sub>NDM-7</sub> in *Enterobacteriaceae* from Calgary, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de marzo de 2016;60(3):1258-63.
234. **Dortet L, Poirel L, Nordmann P.** NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Rods. *Human Emerging and Re-emerging Infections.* 2015. p. 897-913.
235. **Boulanger A, Naas T, Fortineau N, Figueiredo S, Nordmann P.** NDM-1-

- producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. Vol. 56, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2012. p. 2214-5.
236. **Espinal P, Fugazza G, López Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, et al.** Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli Rehabilitation Center. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(11):5396-8.
237. **Zhang C, Qiu S, Wang Y, Qi L, Hao R, Liu X, et al.** Higher Isolation of NDM-1 Producing *Acinetobacter baumannii* from the Sewage of the Hospitals in Beijing. PLoS One. 2013;8(6):e64857.
238. **Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al.** Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48(1):1-12.
239. **Reyes A, Villa J, Viedma E, Chaves F.** (mayo, 2019). Emergencia policlonal de *Escherichia coli* resistente a carbapenem en el Hospital Universitario 12 de Octubre. Comunicación presentada en XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.

**ANEXOS**



## Draft Whole-Genome Sequence of VIM-1-Producing Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* EC\_38VIM1

Jennifer Villa, Esther Viedma, Joaquín R. Otero, Fernando Chaves

Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

The VIM-1-producing multidrug-resistant strain *Enterobacter cloacae* was isolated from blood culture. The strain showed multiple resistances to clinically used antibiotics, including all  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones, aminoglycosides, and sulfonamides. Sequence analysis showed the presence of 14 genes associated with resistance to antibiotics, including the metallo- $\beta$ -lactamase VIM-1 gene, which was located in a class 1 integron.

Received 6 August 2013 Accepted 7 August 2013 Published 5 September 2013

Citation: Villa J, Viedma E, Otero JR, Chaves F. 2013. Draft whole-genome sequence of VIM-1-producing multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* EC\_38VIM1. *Genome Announc* 1(5):e00694-13. doi:10.1128/genomeA.00694-13.

Copyright © 2013 Villa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported license.

Address correspondence to Fernando Chaves, fernando.chaves@salud.madrid.org.

*Enterobacter cloacae* is an important nosocomial pathogen and is intrinsically resistant to ampicillin and narrow-spectrum cephalosporins. Resistances to extended-spectrum cephalosporins and aztreonam are usually related to a mutational depression of the chromosomal Ambler class C  $\beta$ -lactamase or to the production of plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (1). *E. cloacae* carbapenem-resistant clinical isolates are unusual. However, class B metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) have been reported recently in several strains of *E. cloacae* (2, 3). MBLs confer resistance to all available  $\beta$ -lactams except aztreonam, and they are not inhibited by class A  $\beta$ -lactamase inhibitors. The most common MBLs include VIM, IMP, GIM, and SIM enzymes (4). The VIM-1 type is normally confined to *Enterobacteriaceae* isolates, and *bla*<sub>VIM-1</sub> genes are located within class 1 integrons, which have been incorporated as gene cassettes. In addition, *bla*<sub>VIM-1</sub> can be associated with resistance to other antibiotics, such as aminoglycosides, sulfonamides, and fluoroquinolones (5, 6).

The *E. cloacae* EC\_38VIM1 strain was isolated from a blood culture of a liver transplant recipient who died as a result of septic shock secondary to cholangitis due to EC\_38VIM1. The strain showed multiple resistances to clinically used antibiotics, including all  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones, aminoglycosides, and sulfonamides, with the exceptions of amikacin and colistin.

Genomic DNA was extracted from an overnight culture using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen). Whole-genome shotgun sequencing of *E. cloacae* EC\_38VIM1 was carried out by using a Roche 454 Junior sequencer according to the manufacturer's recommended protocol to generate 28-fold coverage. *De novo* assembly was performed using Roche Newbler v2.7 (Roche), obtaining a total of 165,540,445 bp and 338,715 reads. The EC\_38VIM1 assembly resulted in 90 contigs, with an *N*<sub>50</sub> contig size of 262,093 nucleotides and a total length of 5,155,870 bp. Contigs were annotated using the Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) through NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), providing a total of 4,999 genes, 4,864 coding DNA sequence (CDS) genes, 56 pseudogenes, 4 rRNAs (5S, 16S, and 23S), and 75 tRNAs. Additionally, genome annotation was

performed automatically on the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server (7), and all open reading frames obtained from the RAST annotation were subjected to analysis using the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (<http://arpcard.mcmaster.ca>) (8). This analysis highlighted the presence of 14 genes associated with resistance to antibiotics and toxic compounds, including genes associated with specific resistance to  $\beta$ -lactams (AmpC  $\beta$ -lactamase [*bla*<sub>AmpC</sub>] and metallo- $\beta$ -lactamase [*bla*<sub>VIM-1</sub>]), aminoglycosides (streptomycin 3'-adenylyltransferase [*aadA1*] and aminoglycoside 6-adenylyltransferase [*aacA4*]), fluoroquinolones (plasmid-mediated quinolone resistance [*qnrA1*]), chloramphenicol (chloramphenicol acetyltransferase [*catB2*]), and sulfonamides (dihydrofolate reductase [*dhfrB1*]). Sequencing showed that the *bla*<sub>VIM-1</sub> gene was contained in a class 1 integron. The structure of the integron was *intI* (integrase gene)-*bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA4*-*dhfrB1*-*aadA1*-*catB2*-*quacEΔ1/sul1* (quaternary ammonium compound resistance gene/sulfonamide resistance gene). An analysis of the genome of EC\_38VIM1 identified the sequences of three plasmids, which belonged to the IncH1, IncF, and IncI groups. Overall, the availability of this genome sequence facilitates further comparative genomic analyses among *E. cloacae* strains with different antimicrobial susceptibility patterns in order to shed light on the classical and new antibiotic resistance mechanisms in this pathogen.

**Nucleotide sequence accession number.** The draft genome sequence of *E. cloacae* EC\_38VIM1 has been included in the GenBank whole-genome shotgun (WGS) database under the accession no. ATHX000000000.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Plan Nacional de I+D+i 2008-2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad (Spanish Network for Research in Infectious Diseases REIPI RD12/0015), cofinanced by the European Development Regional Fund (ERDF), "A way to achieve Europe."



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>

## Short Communication

Multiclonal spread of VIM-1-producing *Enterobacter cloacae* isolates associated with In624 and In488 integrons located in an IncHI2 plasmidJennifer Villa, Esther Viedma, Patricia Brañas, M<sup>a</sup> Angeles Orellana, Joaquín R. Otero, Fernando Chaves<sup>\*</sup>

Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n, Madrid 28041, Spain



## ARTICLE INFO

Article history:  
Received 23 January 2014  
Accepted 5 February 2014

Keywords:  
*Enterobacter cloacae*  
VIM-1  
IncHI2 plasmid  
Integron

## ABSTRACT

Over a 6-year period (2007–2012), the emergence of *Enterobacter cloacae* isolates resistant to  $\beta$ -lactams and with reduced susceptibility to carbapenems was observed in Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain). To determine the possible role of metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) in the resistance profile of these isolates, a molecular and clinical epidemiological study was performed, including determination of patients' clinical characteristics, genetic diversity of strains, resistance mechanisms to carbapenems, and the genetic environment of VIM-1. A total of 73 *E. cloacae* isolates showed resistance to extended-spectrum cephalosporins and reduced susceptibility to at least one carbapenem during 2007–2012. PCR amplification revealed the presence of *bla*<sub>VIM-1</sub> gene in 37 isolates, *bla*<sub>VIM-2</sub> in 1 isolate and *bla*<sub>KPC</sub> in 5 isolates. Molecular typing showed high clonal diversity of *E. cloacae* isolates carrying *bla*<sub>VIM-1</sub>. The genetic environment of *bla*<sub>VIM-1</sub> was investigated and two integron structures were found: *int1-bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA4-dfrB1-aadA1-catB2-qac $\Delta$ 1/su1* (In624); and *int1-bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA4-aadA1-qac $\Delta$ 1/su1* (In488). Isolates belonging to three clones (A, F and G) harboured different types of integron (In624 or In488) despite belonging to the same clone. Conjugal experiments showed an association with a conjugative plasmid of ca. 300 kb belonging to IncHI2 group, which is common in Spanish hospitals, suggesting that the widespread dissemination of *bla*<sub>VIM-1</sub> may be due to horizontal transfer of mobile genetic determinants rather than the result of spreading of a few clones. These results have implications for infection control programmes in the hospital.

© 2014 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Enterobacter cloacae* is an important nosocomial pathogen that is intrinsically resistant to ampicillin and narrow-spectrum cephalosporins owing to a chromosomal cephalosporinase. Carbapenem-resistant clinical isolates of *E. cloacae* are unusual. However, in recent years the emergence of carbapenem-resistant *E. cloacae* isolates has been observed owing to acquired metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) in these micro-organisms [1,2].

MBLs exhibit a broad spectrum of hydrolytic activity, including all penicillins, cephalosporins and carbapenems, with the exception of monobactams. The most common MBLs include VIM, IMP, GIM, SIM and NDM enzymes [1]. Genes encoding

VIM-1-type MBLs are the most commonly identified in *E. cloacae* and are often carried on mobile genetic elements such as plasmids and transposons. In addition, such mobile elements may also carry integrons including genes encoding drug resistance to aminoglycosides, sulphonamides and fluoroquinolones through aminoglycoside-modifying enzymes, dihydrofolate reductase (*dfr*) and plasmid-mediated quinolone resistance (*qnr*), respectively [3–5].

Since the first case of carbapenem-resistant *E. cloacae* was detected in Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain) in 2007, we have observed a sharp increase in these strains in different clinical wards. To gain insights in the evolution of carbapenem-resistant *E. cloacae*, a molecular and clinical epidemiological study was conducted to describe the genetic diversity of strains, resistance mechanisms to carbapenems, and the genetic environment of *bla*<sub>VIM-1</sub> in carbapenem-resistant *E. cloacae* isolates.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +34 917 792 404.  
E-mail address: [fernando.chaves@salud.madrid.org](mailto:fernando.chaves@salud.madrid.org) (F. Chaves).





## Draft Whole-Genome Sequence of OXA-48-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* KP\_ST11\_OXA-48

Jennifer Villa,<sup>a</sup> Esther Viedma,<sup>a,b</sup> Patricia Brañas,<sup>a</sup> Jesús Mingorance,<sup>b,c</sup> Fernando Chaves<sup>a,b</sup>

Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain<sup>a</sup>; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain<sup>b</sup>; Hospital Universitario la Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain<sup>c</sup>

We present the draft genome sequence of a blood culture isolate of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* (sequence type 11 [ST11]) obtained in the course of a hospital outbreak in Spain. Sequence analysis showed 121 genes related to antibiotic and anti-septic resistance, including *bla*<sub>OXA-48</sub>, which was located in an IncL/M plasmid.

Received 30 June 2014 Accepted 16 July 2014 Published 31 July 2014

Citation: Villa J, Viedma E, Brañas P, Mingorance J, Chaves F. 2014. Draft whole-genome sequence of OXA-48-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* KP\_ST11\_OXA-48. *Genome Announc.* 2(4):e00737-14. doi:10.1128/genomeA.00737-14.

Copyright © 2014 Villa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported license.

Address correspondence to Fernando Chaves, fernandochaves@salud.madrid.org.

Nosocomial pathogen *Klebsiella pneumoniae* is associated with serious illnesses, and the problem is aggravated due to its propensity to acquire multidrug resistance (1, 2). The spread of OXA-48 producers is now considered an endemic threat in *K. pneumoniae* and represents an important source of multidrug resistance in Europe (3, 4).

The *K. pneumoniae* strain KP\_ST11\_OXA-48 was isolated from a blood culture in the setting of a large outbreak by an OXA-48-producing multidrug-resistant *K. pneumoniae* clone affecting a total of 44 patients. The strain belonged to sequence type (ST) 11. This clone emerged in our hospital in 2013 and currently persists despite the control measures implemented. The strain showed multiple resistances to clinically used antibiotics, including all  $\beta$ -lactams (ertapenem, meropenem, and imipenem showed MICs of  $\geq 32$   $\mu$ g/ml), fluoroquinolones, aminoglycosides (except for amikacin), sulfonamides, macrolides, and tetracyclines. It was susceptible to colistin and fosfomycin.

Next-generation sequencing was performed on a Roche 454 Junior sequencer to generate 31.0-fold coverage (2 runs). *De novo* assembly was performed using Roche Newbler version 2.7 (Roche) and generated 185,726,039 bp and 400,168 reads. The KP\_ST11\_OXA-48 assembly resulted in 124 contigs, with an  $N_{50}$  contig size of 203,680 nucleotides and a total length of 5,580,994 bp. Contigs were annotated using the Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) through NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), providing a total of 5,342 genes, 5,198 coding DNA sequence genes, 41 pseudogenes, 8 rRNAs (5S, 16S, and 23S), 81 tRNAs, and 14 noncoding RNAs (ncRNAs). Analyses of antibiotic, biocide, and metal resistance were performed with the Comprehensive Antibiotic Resistance database (CARD) and the Antibacterial Biocide and Metal Resistance Genes Database (BacMet) (5, 6).

This approach highlighted the presence of 121 genes related to antibiotic, antiseptic, and toxic compound resistance, including genes associated with specific resistance to  $\beta$ -lactams (*bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>ACT</sub>, *bla*<sub>CTXM-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, and *bla*<sub>OXA-48</sub>), aminoglycosides [*aac*(6)-Ib-cr, *aac*(3)-IIa, *aadA2*, and *aph*(3')-Ia], fluoroquinolones

(*qnrB1*), macrolides (*mph-A*), phenicol (*catA1* and *catB2*), and sulfonamide-trimethoprim (*sul1* and *dhfrA12*), as well as resistance determinants to metals such as arsenic, copper, cobalt-zinc-cadmium, chromium, and mercury. The genome showed the presence of one integron that is composed of the gene cassette array *int1-dhfrA12-aadA2-qac $\Delta$ 1/sul1*, named Int 27 by the Integron Database (<http://integrd.bio.ua.pt/>). In addition, we observed alterations in the *gyrA* subunit and the *parC* subunit that play major roles in the development of fluoroquinolone resistance. Also, we found the virulence factor P-related fimbriae regulatory gene (*prfB*) and a biocide resistance gene (*ogxA-B*) that coselect antibiotics such as chloramphenicol, ciprofloxacin, and trimethoprim and toxic compounds such as chlorhexidine, sodium dodecyl sulfate, benzylalkonium chloride, and tridolan. The analysis of the genome revealed sequences that belonged to four plasmids (IncFIB, IncFII, IncL/M, and IncR groups). This strain showed that the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene was located in the IncL/M plasmid (62,811 bp), which includes a *tir* gene that is truncated by a *bla*<sub>OXA-48</sub> gene.

We present the sequence of an OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate belonging to ST11, a clone that is often associated with hospital outbreaks and is the major clone of OXA-48 producers in the Madrid region. This sequence information might be a useful tool to study the behavior of these epidemic strains that have spread rapidly and can persist over time in health care institutions.

**Nucleotide sequence accession number.** The draft genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* KP\_ST11\_OXA-48 has been included in the GenBank whole-genome shotgun (WGS) database under the accession no. JNHB00000000.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Plan Nacional de I+D+i 2008-2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad





Short communication

Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone



Patricia Brañas<sup>a,1</sup>, Jennifer Villa<sup>a,1</sup>, Esther Viedma<sup>a,b</sup>, Jesús Mingorance<sup>b,c</sup>,  
M. Angeles Orellana<sup>a,b</sup>, Fernando Chaves<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REDI 20015), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Hospital Universitario la Paz, IdiPAZ, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2014

Received in revised form 11 February 2015

Accepted 12 February 2015

Keywords:

*Klebsiella pneumoniae*

Multidrug-resistant

ST11

OXA-48

Molecular epidemiology

ABSTRACT

Here we report a retrospective clinical and molecular study conducted in a tertiary care facility in southern Madrid, Spain, from January 2009 to February 2014 to investigate the epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (CPKp). Carbapenemase genes were identified in 97 non-duplicate *K. pneumoniae* isolates, including 59 harbouring *bla*<sub>OXA-48</sub>, 37 harbouring *bla*<sub>NDM-1</sub> and 1 harbouring *bla*<sub>IMP-2</sub>. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis verified the presence of 20 different clonal types, whilst multilocus sequence typing (MLST) assigned the isolates to eight sequence types (STs). A gradual increase was noted in the number of CPKp isolated, ranging from 0.8% in 2009 to 4.3% in 2013. A large outbreak was also identified, initiated in 2013 owing to a *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> co-producing ST11 clone and involving a total of 44 patients. Whole-genome sequencing was used to characterise the resistome of a representative isolate from this outbreak. Bioinformatics analysis revealed the presence of 121 genes related to antibiotic and antiseptic resistance, mutations in the *ompK35* and *ompK36* genes, and the presence of the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene on a 62 811 bp IncI/M-type plasmid as part of a TnI 999.2 composite transposon. These results portray the increasing trend in carbapenemase-producing isolates in this hospital and highlight the successful establishment of a *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> co-producing ST11 clone that has led to the displacement of previous circulating clones.

© 2015 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

The emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) is a major clinical concern [1]. In August 2007, the first CPE was identified in Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain), being a VIM-1-producing *Enterobacter cloacae*. Dissemination of the *bla*<sub>VIM-1</sub> gene in *E. cloacae* has been polyclonal and became a major infection control issue over the following 2 years [2]. In June 2009, the first carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (CPKp) was detected. Since then, *K. pneumoniae* has replaced *E. cloacae* as the main CPE. To gain an insight into

the evolution of CPKp infections, a clinical and molecular study was conducted to investigate the underlying epidemiology of carbapenem resistance mechanisms in *K. pneumoniae*. The aim was to report the displacement of other pre-existing clones in favour of a sequence type 11 (ST11) *K. pneumoniae* clone, responsible for a large outbreak in our hospital. The whole genome of a representative isolate from this outbreak was also sequenced [3] to comprehensively evaluate the resistome of the OXA-48 ST11 clone.

2. Materials and methods

2.1. Study population

A retrospective study of all patients infected or colonised with CPKp from January 2009 to February 2014 was conducted in a tertiary care facility in southern Madrid, Spain. Medical charts were reviewed and demographic and clinical information was collected.

\* Corresponding author at: Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n, Madrid 28041, Spain. Tel.: +34 917 792 404.

E-mail addresses: [fernando.chaves@salud.madrid.org](mailto:fernando.chaves@salud.madrid.org), [fcchaves@salud.madrid.org](mailto:fcchaves@salud.madrid.org) (F. Chaves).

<sup>1</sup> These two authors contributed equally to this article.



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

## Epidemiología molecular de las infecciones/colonizaciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de Madrid



Patricia Brañas\*, Marta Gil, Jennifer Villa, María Ángeles Orellana y Fernando Chaves

Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

**Historia del artículo:**  
Recibido el 9 de agosto de 2016  
Aceptado el 5 de octubre de 2016  
On-line el 17 de noviembre de 2016

**Palabras clave:**  
Enterobacterias  
Carbapenemasas  
*Klebsiella pneumoniae*  
OXA-48  
Epidemiología molecular

### RESUMEN

**Introducción:** Se describe la epidemiología molecular de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital terciario.  
**Material y métodos:** Se incluyeron todos los aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasas obtenidos entre febrero de 2015 y marzo de 2016 en el Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Se utilizaron métodos fenotípicos y moleculares.  
**Resultados:** Se identificaron 7 especies bacterianas, predominando *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (78,9%) y *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) (16,4%). La resistencia en *K. pneumoniae* y *E. cloacae* para carbapenemas fue del 88,7 y 88,6% para ertapenem, 21,4 y 54,3% para imipenem, y 20,8 y 34,3% para meropenem. El tipo de carbapenemasa más frecuente en *K. pneumoniae* fue OXA-48 (91,1%) y en *E. cloacae* VIM (71,4%). Se identificaron 9 tipos clonales de *K. pneumoniae*, incluyendo uno mayoritario perteneciente al tipo de secuencia ST11, y 16 de *E. cloacae*.  
**Conclusiones:** El incremento actual de enterobacterias productoras de carbapenemasas se debe en gran medida a la diseminación de *K. pneumoniae* productora de OXA-48.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

### Molecular epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae infection/colonisation in a hospital in Madrid

#### ABSTRACT

**Introduction:** A description is presented on the molecular epidemiology of carbapenemase-producing enterobacteriaceae infection in a tertiary hospital.  
**Material and methods:** A study was made on all the carbapenemase-producing enterobacteriaceae isolations obtained between February 2015 and March 2016 in the Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Phenotypic and molecular methods were used.  
**Results:** A total of 7 bacterial species were identified, with the majority being *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (78.9%) and *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) (16.4%). The resistance of *K. pneumoniae* and *E. cloacae* for carbapenems was 88.7 and 88.6% for ertapenem, 21.4 and 54.3% for imipenem, and 20.8 and 34.3% for meropenem, respectively. The most frequent carbapenemase type was OXA-48 (91.1%) and VIM (71.4%) in *E. cloacae*. A total of 9 *K. pneumoniae* clonal types were identified, including a majority pertaining to the sequence type ST11. In *E. cloacae*, 16 clonal types were identified.  
**Conclusions:** The current increase in carbapenemase-producing enterobacteriaceae is mainly due to the spread of OXA-48-producing *K. pneumoniae*.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.  
Correo electrónico: patricia.branas@gmail.com (P. Brañas).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.10.004>

0213-005X/© 2016 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.



## Characterization of mobile genetic elements carrying VIM-1 and KPC-2 carbapenemases in *Citrobacter freundii* isolates in Madrid

Jennifer Villa<sup>a</sup>, David M. Arana, Esther Viedma, Dafne Perez-Montarelo, Fernando Chaves

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Citrobacter freundii*  
Carbapenemase  
VIM-1  
KPC-2  
Inc624  
Whole genome sequencing

### ABSTRACT

Carbapenemase-producing *Citrobacter freundii* (CPCF) infections are still uncommon in European countries. Here we report a molecular study conducted in a tertiary care facility in southern Madrid, Spain, from 2009 to 2014 to investigate the epidemiology of CPCF. The *bla<sub>IMP-1</sub>*, *bla<sub>IMP-2</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>VIM-1</sub>* and *bla<sub>VIM-2</sub>* genes were screened by PCR. Molecular typing was carried out by Pulsed-field gel electrophoresis analysis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). Whole genome sequencing (WGS) was performed to characterize the resistome and the mobile genetic elements associated with the carbapenemase resistance of CPCF. A total of 11/521 (2.1%) isolates had reduced susceptibility to carbapenems. PCR amplification revealed the presence of *bla<sub>VIM-1</sub>* in 10 isolates and *bla<sub>KPC-2</sub>* in 2 isolates. One *C. freundii* isolate co-harbored *bla<sub>VIM-1</sub>* and *bla<sub>KPC-2</sub>* genes. PFGE and MLST assigned 10 different clonal, 4 previously reported (ST11, ST18, ST22 and ST64) and 6 new STs (ST89, ST90, ST91, ST92, ST93 and ST94). The *bla<sub>VIM-1</sub>* gene was part of Inc624 (*int1-bla<sub>VIM-1</sub>-aacA-*qtrA*-aadA1-aadA2-qacEΔ1/sul1*). In 3 of these isolates, plasmid-mediated quinolone resistance genes (*qnrA1* and *qnrB4*) were present in its downstream region, taking part of a complex class 1 integron (*[Inc624:ISC1:qnrB4-bla<sub>VIM-1</sub>]* and *[Inc624:ISC1:qnrA1]*). On the other hand, the *bla<sub>KPC-2</sub>* gene was associated with a Tn3-based transposon. The dissemination of the *bla<sub>VIM-1</sub>* gene among various clones suggests a successful horizontal transfer of integron carrying elements that play a dominant role in the development of multidrug resistance in *Enterobacteriaceae*.

### 1. Introduction

The emergence and spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) have been observed throughout the world, representing an epidemiological risk within healthcare systems, and which is a serious threat to public health due to the significant limitations of antimicrobial therapy (Nordmann and Poirel, 2014). *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* are the most commonly found CPE in Europe, whereas other *Enterobacteriaceae* such as *Citrobacter freundii* are still uncommon (Koratzanis et al., 2011; Nordmann and Poirel, 2014).

*C. freundii* is an opportunistic pathogen that can colonize the intestinal tract of humans and animals, and it has been associated with a wide spectrum of infections involving the gastrointestinal, urinary and respiratory tracts. Few studies have reported *C. freundii* harboring carbapenemases, particularly metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) or *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) types (Gaibani et al., 2013; Protonotariou et al., 2008; Weile et al., 2007). The VIM-1 enzyme is most commonly identified in *K. pneumoniae* and *E. cloacae* and is often carried on mobile genetic elements such as plasmids and transposons

(Aschbacher et al., 2011; Koratzanis et al., 2011; Oteo et al., 2015; Tato et al., 2007). In addition, such mobile elements may also carry integrons including genes encoding drug resistance to aminoglycosides, sulphonamides and fluoroquinolones through aminoglycoside-modifying enzymes, dihydrofolate reductase (*dhfr*) and plasmid-mediated quinolone resistance (*qnr*), respectively (Schultz and Geerlings, 2012). The *bla<sub>KPC</sub>* genes have been found on numerous plasmid types in *Enterobacteriaceae*, but predominantly in IncF with HIK replicons. KPCs are associated with a promiscuous transposon, Tn4401 (Lee et al., 2016a,b; Schultz and Geerlings, 2012).

Since the first case of CPE was detected in our hospital in 2007, the predominant CPE were OXA-48-producing *K. pneumoniae* and VIM-1-producing *E. cloacae* (Bañares et al., 2015; Villa et al., 2014). During this period, we also observed the emergence of carbapenemase-producing *C. freundii* (CPCF) infections. In this study, whole genome sequencing (WGS) was performed to characterize the resistome and the mobile genetic elements of the CPCF isolates occurring in the hospital setting. This study provides novel insights into the spread of resistance determinants in *C. freundii* isolates through mobile elements involved in the emergence and spread of multidrug-resistant species.

<sup>a</sup> Corresponding author at: Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n, Madrid 28041, Spain.  
Email address: [jennifer.villa@salud.madrid.org](mailto:jennifer.villa@salud.madrid.org) (J. Villa).

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.008>

Received 4 May 2017; Received in revised form 28 June 2017; Accepted 2 July 2017  
1438-4221/© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijantimicag](http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag)

## Letter to the Editor

Emergence of NDM-7-producing multi-drug-resistant *Enterobacter hormaechei* sequence type ST-78 in Spain: a high-risk international clone

Sir,

*Enterobacter cloacae* complex (ECC) is an important nosocomial pathogen that is intrinsically resistant to many antibiotics, and harbours clonal lineages of increased epidemic potential that may be associated with the spread of resistance [1]. In recent years, a global emergence of carbapenem-resistant *E. cloacae* complex (CR-ECC) has been observed, mainly due to VIM-type carbapenemase, followed by NDM, KPC, OXA-48 and IMP [1]. In Spain, VIM is the most common carbapenemase in ECC, although KPC and OXA-48 have also been detected [2,3]. NDM has been described in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, but never in ECC [3,4].

Here, we report three cases of NDM-producing multi-drug-resistant ECC infection in our tertiary hospital. The three patients were elderly, had many comorbidities, and had never travelled outside of Spain. Patient 1 was a 76-year-old woman who underwent kidney transplantation. During hospitalization, she was diagnosed with a urinary tract infection with CR-ECC (Table 1). Contact isolation and active surveillance protocols were initiated. During the following 7 months, she was admitted to the nephrology ward on several occasions, and four isolates of CR-ECC were obtained from urine and rectal swab cultures (10/2016, 01/2017, 02/2017 and 03/2017). All isolates showed the same antimicrobial resistance pattern, with the exception of the last two isolates which were resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole. Patient 2, a 76-year-old man, was diagnosed with CR-ECC urinary tract infection at a primary care centre in January 2017. The patient had a history of admission to the hospital from September to December 2016. Patient 3, an 81-year-old woman, was admitted to the nephrology ward in February 2017. After 7 days, she was diagnosed with CR-ECC skin and soft tissue infection. The nine isolates obtained from the three patients were identified as *E. cloacae* using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. All were resistant to beta-lactams (including aztreonam, ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam), carbapenems, aminoglycosides and fluoroquinolones (Table 1). The modified Hodge test and MBL-Etest yielded positive results which indicated that they were metallo-beta-lactamase (MBL) producers. Polymerase chain reaction amplification and nucleotide sequence analysis detected NDM-7-MBL in the isolates. Previously, *bla*<sub>NDM-7</sub> had been the most prevalent mechanism of CR-ECC in the study hospital [2]. Pulsed-field gel electrophoresis after chromosomal DNA digestion with *Xba*I was performed, and all CR-ECC isolates showed identical patterns of DNA macrorestriction.

In order to complete the molecular epidemiology study, whole-genome sequencing (WGS) was performed on the first isolate of

CR-ECC obtained from each patient (see online supplementary material). The isolates were identified by pairwise average nucleotide identity as *Enterobacter hormaechei* (>99% identity). WGS analysis confirmed that the three isolates had an NDM-7 carbapenemase gene and other resistance genes such as *bla*<sub>CTXM-15</sub> (Table 1). Three plasmid replicons were identified that belonged to IncA/C2, IncFIB and IncX3 groups. The *bla*<sub>NDM-7</sub> gene was located on a 45 122-bp IncX3 plasmid, inserted into an IS26-dsbc-trpF-*bla*<sub>NDM-7</sub>-*bla*<sub>NDM-7</sub>- $\Delta$ ISAba125-*ISS*- $\Delta$ ISAba125 genetic element (Figs 1S and 2S, see online supplementary material). The plasmid structure, pEC-NDM-7, was identical in all three sequenced isolates, and showed 100% identity to pOM26-1 (KP776609). Interestingly, IncX3 plasmid was involved in the spread of NDM-7 among different species of Enterobacteriaceae [5]. Core-genome single-nucleotide-polymorphism-based phylogenetic analysis revealed that the three isolates were closely related (Fig. 3S, see online supplementary material), and belonged to sequence type ST-78. It is important to highlight that ST-78 represents an international lineage that has been identified in several countries in Europe (Poland, Spain, Italy, Greece, Turkey) and the Asian-Pacific region, carrying different resistant determinants, including OXA-48, VIM-1, KPC-2 and IMP-1/4/8 [1].

A recent study reported the first outbreak of NDM-7-producing *K. pneumoniae* in Spain and demonstrated the spread of this clone among patients from three hospitals in Madrid [6]. Although we do not have sufficient information to trace the micro-evolution of this clone, it is likely that strain EH\_1 had evolved, and another isolate EH\_1 resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole had been transmitted to Patient 3. However, this cannot be confirmed as only the first EH\_1 trimethoprim-sulfamethoxazole-susceptible isolate was sequenced. It is not known how Patient 2 could have been infected with this strain, because he was admitted to a different unit, and did not share a room, healthcare equipment or personnel with Patients 1 and 3. It is likely that there were patients colonized by *E. hormaechei* ST-78 NDM-7 in the hospital who were not detected, or NDM-7 may have been circulating in other enterobacterial species and could have been acquired by this ST-78 clone. We report here the emergence of NDM-7-producing *E. hormaechei* ST-78 in Spain. This high-risk clone has been identified in several European countries associated with different carbapenemase types, and now with NDM-7.

## Nucleotide sequence accession numbers

The Whole Genome projects have been deposited at the DDBJ/EMBL/GenBank under the following accession numbers and BioProjects: EH\_1 (QNV000000000, PRJNA476574), EH\_2 (QNVQ000000000, PRJNA476575) and EH\_3 (QNV000000000, PRJNA476576).

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.009>

0924-6460/© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.



## Emergencia policlonal de *Escherichia coli* resistente a carbapenem en el Hospital Universitario 12 de Octubre

Alhena Reyes<sup>\*1</sup>, Jennifer Villa<sup>1</sup>, Esther Viedma<sup>1</sup>, Fernando Chaves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología; Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

0270

### Introducción

*Escherichia coli* es un patógeno oportunista común en infecciones de origen nosocomial y comunitario. La prevalencia de *E. coli* resistente a carbapenem (ECRC) está aumentando globalmente y se debe principalmente a la adquisición de carbapenemasas. El objetivo de este trabajo fue describir la epidemiología molecular de los aislados de ECRC procedentes de los pacientes de nuestro centro en los últimos años.

### Material y Métodos

Se realizó un estudio retrospectivo que incluyó todos los pacientes infectados o colonizados por ECRC hasta junio de 2018.

**Pacientes:** Se revisaron sus historias clínicas para la recogida de los datos demográficos, patología de base, hospitalización y tipo de muestra clínica recogida.

**Estudio microbiológico:** incluyó únicamente el primer aislamiento ECRC de cada paciente. La sensibilidad antimicrobiana se determinó mediante microdilución y/o Etest para todos los antibióticos, incluyendo ceftazidima/avibactam. El tipo de carbapenemasa se estudió mediante técnicas fenotípicas y PCR-secuenciación. La clonalidad de los aislados se determinó mediante electroforesis en gel de campos pulsados (ECP) con la enzima XbaI. En un aislamiento de ECRC se realizó secuenciación de genoma completo mediante la tecnología de Illumina.

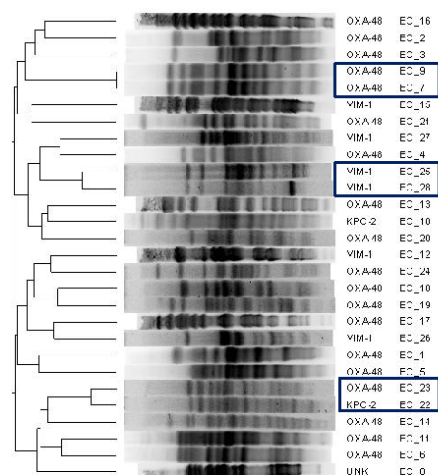


Figura 2. Variedad clonal de 28 aislamientos ECRC mediante ECP.

### Resultados

- Se detectaron 28 aislamientos de ECRC detectados durante el periodo de estudio (Figura 1).
- Once (39,3%) correspondieron a colonizaciones y 17(60,7%) a infecciones, de las que 7 fueron infecciones urinarias, 7 infecciones relacionadas con cirugía digestiva y 3 bacteriemias.
- De los 28 pacientes, 11(39,9%) fueron receptores de trasplante, 8(28,6%) oncológicos, 1(3,4%) hematológico y 8(28,6%) tenían otras patologías de base.
- Por tipo de carbapenemasa, 18 de fueron productores de OXA-48 (64,3%), 7 de VIM-1 (25%), 2 de KPC-2 (7,2%) y 1 no fue productor de carbapenemasa (NPC).

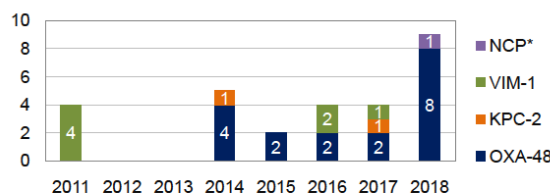


Figura 1. Incidencia y tipo de carbapenemasa de ECRC por año. NPC: no productor de carbapenemasa.

- En 4 (14,3%) casos se detectaron aislamientos previos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPPC) y 3 (10,7%) en la misma muestra.
- Según criterios de EUCAST, se obtuvieron 24 (85,7%) aislamientos intermedios/resistentes a ertapenem, 14 (50%) a imipenem, 11 (39,9%) a meropenem, 7 (25%) a ceftazidima/avibactam, 19 (67,9%) a ciprofloxacino, 17 (60,7%) a trimetoprim/sulfametoxazol, 3 (10,7%) a fosfomicina y 1 (3,6%) a amikacina. El 100% mantuvo sensibilidad a tigeciclina, colistina y nitrofurantoína.
- El aislado NPC, con alto nivel de resistencia a carbapenem (CMI para ertapenem e imipenem de >32mg/L y meropenem de 16mg/L), mostró por secuenciación de genoma completo la presencia de beta-lactamasas *bla*TEM-1B y *bla*CMY-2, y una delección de 11pb en *OmpF*.
- De 28 aislamientos ECRC, la ECP mostró 25 diferentes tipos clonales (Figura 2). Uno de los tipos clonales incluía dos aislamientos obtenidos en 2011 portadores de VIM-1, otro incluía un aislado KPC-2 y otro OXA-48 obtenidos en 2014, y un tercer tipo clonal incluía dos aislamientos OXA-48 obtenidos en 2018.

### Conclusiones

- Desde los primeros casos de ECRC en 2011 se ha producido una expansión policlonal en nuestro hospital, con un aumento considerable en 2018 fundamentalmente a expensas de OXA-48.
- La detección de casos de KPPC en aislamientos previos y simultáneos con ECRC podría sugerir la transferencia de carbapenemasas en elementos genéticos móviles hacia diferentes clones de *E. coli*.
- Aunque carbapenemasas constituyen el principal mecanismo de resistencia a carbapenems, otros mecanismos se deben tener en cuenta.